

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE**  
**ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Rose Marie Meinicke**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus***  
***rubor* CCT 3802 UTILIZANDO GLICEROL COMO**  
**SUBSTRATO EM CULTIVO SUBMERSO**

Florianópolis

2008

Rose Marie Meinicke

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus*  
*ruber* CCT 3802 UTILIZANDO GLICEROL COMO  
SUBSTRATO EM CULTIVO SUBMERSO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Santa Catarina como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em Engenharia de  
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Florianópolis

2008

## **Agradecimentos**

A Jesus Cristo, Sr. da minha vida.

Ao Prof. Jorge Luiz Ninow pela orientação deste trabalho.

A Francielo Vendruscolo e Luana de Oliveira Pitol pelo auxílio.

Aos meus estimados pais Iris e Horst pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu amado Cristiano Bühler pelo companheirismo e amor.

As minhas irmãs Ana Cristine e Rose Anne e ao meu cunhado Roger pelos momentos compartilhados.

A todos os colegas do Engebio pela ajuda.

A CAPES pelo suporte financeiro concedido.

*Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito (Rm, 8.28).*

## RESUMO

A cor é um atributo muito importante nos alimentos. Uma vez que o número de corantes sintéticos permitidos está diminuindo devido aos seus efeitos indesejáveis, o foco no desenvolvimento de pigmentos para alimentos de fontes naturais está aumentando. Na natureza existem muitos microrganismos produtores de pigmentos como fungos, leveduras e bactérias. Algumas espécies do fungo filamentoso *Monascus* são capazes de produzir diferentes pigmentos em tonalidades que variam entre vermelho, amarelo e laranja por processos biotecnológicos. O *Monascus ruber* é o mais estudado devido à grande produção de pigmentos vermelhos. Os principais substratos estudados são a glicose e o amido. Com o aumento da produção de biodiesel, aumenta a disponibilidade de outro substrato, o glicerol, que é o principal resíduo da produção desse combustível. Uma alternativa interessante para o aproveitamento do glicerol é a sua transformação via microbiológica em metabólicos de interesse industrial. O principal objetivo desse trabalho foi estudar a produção de pigmentos por *Monascus ruber* a partir de glicerol. O trabalho experimental realizou-se em três etapas. Primeiramente, a determinação das velocidades de crescimento radial do fungo e cultivos submersos para verificar a produção de pigmentos e o crescimento utilizando glicerol e/ou glicose como substratos. Na segunda etapa, utilizando glicerol como único substrato avaliaram-se as fontes de nitrogênio, o pH e a concentração do substrato para a máxima produção de pigmentos vermelhos. Por último, realizou-se um planejamento experimental para a otimização da produção de pigmentos vermelhos, variando as concentrações de glicerol e glutamato monossódico em cultivos submersos. Verificou-se que o glicerol pode ser utilizado como substrato para a produção de pigmentos, com produção de até 9 UDO<sub>480</sub> (135 mg.L<sup>-1</sup>) de pigmentos vermelhos. Em glicose, porém, a produção foi de 12 UDO<sub>480</sub>. Entretanto, a velocidade específica de produção de pigmentos foi maior em glicerol. As melhores fontes de nitrogênio encontradas foram o glutamato monossódico, com produtividade de 0,08 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup> e a glicina com produtividade de 0,07 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>. O pH que favoreceu a produção de pigmentos vermelhos foi de 6,5, com inibição da produção de pigmentos vermelhos em pH ácido. Foi verificado que a concentração de fonte de nitrogênio é uma variável muito importante para a solubilização e produção de pigmentos nos cultivos. Em concentrações acima de 5 g.L<sup>-1</sup>, a produção de pigmentos vermelhos foi favorecida. A região ótima encontrada, utilizando metodologia de superfície de resposta, para a produção de pigmentos foi de 40 a 70 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 7 a 8 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico. A produção de pigmentos (7,4 UDO<sub>480</sub>) e a produtividade (0,058 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>) indicam que a produção desse corante por *Monascus*, em cultivos submersos utilizando glicerol, pode ser promissora devido à crescente disponibilidade desse substrato.

PALAVRAS-CHAVE: Pigmentos naturais, *Monascus ruber*, glicerol, cultivo submerso

## ABSTRACT

Colour is an attribute very important in food. Since the number of permitted synthetic colorants has decreased because of the undesirable toxic effects, interest in the development of food pigments from natural sources is increasing. Nature is rich in pigment-producing microorganisms like fungi, yeast and bacteria. Some species of the filamentous fungus *Monascus* produce pigments in different shades ranging from red, yellow and orange by biotechnological processes. The *Monascus ruber* is the most studied because of the large production of red pigments. The main substrates studied are glucose and starch. With the increase in the production of biodiesel, increases the availability of other substrate, glycerol, which is the main residue from the production of this fuel. An interesting alternative to the use of glycerol is its transformation into microbial metabolic pathway of industrial interest. The main objective of this work is to study the production of pigments for *Monascus ruber* from glycerol. The experimental work was held in three stages. First, the determination of the velocities of radial growth of fungus and in submerged medium to check the production of pigments and growth using glycerol and/or glucose as substrates. In the second step, using glycerol as a single substrate was assessing the sources of nitrogen, pH and concentration of the substrate to the maximum production of red pigments. Finally, an experimental design for the optimization of the production of red pigments, varying concentrations of glycerol and monosodium glutamate in submerged cultures. It was found that glycerol can be used as substrate for the production of pigments, with production of up to 9 UDO<sub>480</sub> (135 mg.L<sup>-1</sup>) of red pigments. In glucose, however, production was 12 UDO<sub>480</sub>. However, the specific speed of production of pigments was higher in glycerol. The best source of nitrogen was found monosodium glutamate, with yield of 0,08 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>, followed by glycine. The pH that favored the production of red pigments was 6,5, with inhibition of the production of red pigments in acid pH. Was found that the concentration of nitrogen source is a very important variable for the solubilization and production of pigments in cultures. At concentrations above, 5 g.L<sup>-1</sup>, the production of red pigments was favored. The optimal region, utilizing response surface methodology, for pigment production was around 40 – 70 g.L<sup>-1</sup> of glycerol and 7 – 8 g.L<sup>-1</sup> of monosodium glutamate. The production of pigments (7,4 UDO<sub>480</sub>) and productivity (0,058 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>) indicate that the production of dye by *Monascus* in submerged medium using glycerol can be promising due to the increasing availability of this substrate.

**KEYWORDS:** Natural pigments, *Monascus ruber*, glycerol, submerged medium.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C/N – Razão Carbono/Nitrogênio

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FAO (Food and Agriculture Organization)

G – Concentração de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ )

GMS – Glutamato monossódico

MEA - Ágar extrato de malte

$\text{min}^{-1}$  – Unidade de Frequência de agitação

$P_{\text{células}}$  – Produtividade de células ( $\text{g.h}^{-1}$ )

PDA – Potato Dextrose Agar

P.E. – Ponto de ebulição

P.F. – Ponto de fusão

P.M. – Peso Molecular

$P_M$  – Produtividade máxima em pigmentos ( $\text{UDO.h}^{-1}$ ), no instante de tempo ( $t-t_0$ )

r – Raio da colônia (mm)

$R^2$  – coeficiente de correlação da reta

S – Concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )

t – Tempo

$\text{UDO}_{380}$  – Unidade de Densidade Óptica a 380 nm que representa a quantidade de pigmento amarelo

$\text{UDO}_{420}$  – Unidade de Densidade Óptica a 420 nm que representa a quantidade de pigmento laranja

$\text{UDO}_{480}$  – Unidade de Densidade Óptica a 480 nm que representa a quantidade de pigmento vermelho

$V_{\text{cr}}$  – Velocidade de crescimento radial

X – Biomassa (Concentração celular) ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$Y_{P/G}$  – Fator de conversão de glicerol em pigmentos ( $\text{UDO}_{480}.\text{g}^{-1}$ )

$Y_{P/S}$  – Fator de conversão de glicose em pigmentos ( $\text{UDO}_{480}.\text{g}^{-1}$ )

$Y_{X/S}$  – Fator de conversão de glicose em células ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$Y_{X/G}$  – Fator de conversão de glicerol em células ( $\text{g.g}^{-1}$ )

$\mu_{\text{máx}}$  – Velocidade específica máxima de crescimento

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	11
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.2 OBJETIVOS .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL .....	15
2.1 PIGMENTOS.....	15
2.1.1 A cor .....	15
2.1.2 Legislação Brasileira .....	16
2.1.3 Pigmentos naturais.....	17
2.1.4 Corantes naturais x corantes artificiais .....	20
2.1.5 Mercado de corantes naturais.....	23
2.1.6 Mercados de corantes no Brasil .....	24
2.1.7 Métodos de obtenção de pigmentos, via biotecnológica .....	25
2.2 CARACTERÍSTICAS DOS PIGMENTOS MONASCUS.....	28
2.2.1 Pigmentos Monascus .....	28
2.2.2 Uso e estabilidade dos pigmentos Monascus.....	29
2.3 MICRORGANISMO.....	32
2.3.1 Características do <i>Monascus</i> .....	32
2.3.2 Morfologia do <i>Monascus ruber</i> .....	35
2.3.3 Fatores que influenciam o crescimento e a produção de metabólitos .....	36
2.4 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS .....	37
2.4.1 Produção de pigmentos Monascus em meio sólido/submerso.....	38
2.5 GLICEROL.....	38
2.5.1 Características do glicerol.....	38
2.5.2 Uso do glicerol em processos biotecnológicos .....	42
2.5.3 Biodiesel .....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS .....	45
3.2 MICRORGANISMO.....	45
3.3 MEIOS DE CULTIVO.....	46
3.3.1 Manutenção da cultura.....	46
3.3.2 Inóculo .....	46



3.4 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO.....	47
3.4.1 Preparo do meio de cultura e inoculação do fungo .....	47
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	47
3.5.1 – Determinação da concentração celular .....	47
3.5.2 - Determinação do pH.....	48
3.5.3 - Determinação da concentração de pigmentos.....	48
3.5.4 - Determinação da concentração de glicose.....	48
3.5.5 - Determinação da concentração de glicerol .....	48
3.5.6 – Parâmetros cinéticos .....	49
3.6 CRESCIMENTO RADIAL.....	52
3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO SUBSTRATO PARA O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR <i>Monascus ruber</i> .....	55
4.1 INTRODUÇÃO .....	55
4.2 METODOLOGIA .....	58
4.3 RESULTADOS.....	59
4.3.1 Determinação da velocidade de crescimento radial em diferentes meios sólidos .....	59
4.3.2 Cinética de crescimento e produção de pigmentos utilizando glicose e glicerol como substratos em frascos agitados .....	65
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72
5 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS FONTE DE NITROGÊNIO, pH e CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM CULTIVOS UTILIZANDO GLICEROL COMO SUBSTRATO .....	73
5.1 INTRODUÇÃO .....	73
5.2. METODOLOGIA .....	75
5.3 RESULTADOS.....	76
5.3.1 Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmentos vermelhos...	76
5.3.2 Influência do pH na produção de pigmentos .....	80
5.3.3 Cinéticas de crescimento e produção de pigmentos vermelhos em diferentes concentrações de glicerol .....	84
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
6 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	89

6.1 INTRODUÇÃO .....	89
6.2 METODOLOGIA .....	91
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	99
7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	100
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO .....	100
7.2 CONCLUSÃO .....	101
7.3 PERSPECTIVAS PARA NOVOS ESTUDOS .....	101
REFERÊNCIAS .....	102
APÊNDICE A .....	111
APÊNDICE B.....	112
APÊNDICE C.....	114
APÊNDICE D .....	115
APÊNDICE E .....	117

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1 INTRODUÇÃO

As cores são adicionadas aos alimentos, principalmente, para restituir a aparência original (afetada durante as etapas de processamento, de estocagem, de embalagem ou de distribuição), para tornar o alimento visualmente mais atraente (ajudando a identificar o aroma normalmente associado a determinados produtos), para conferir cor aos desprovidos de cor e para reforçar as cores presentes nos alimentos (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002).

A utilização de pigmentos naturais em alimentos tem aumentado recentemente devido às vantagens do marketing no desenvolvimento de ingredientes naturais e devido à preocupação dos consumidores sobre efeitos prejudiciais dos pigmentos sintéticos à saúde (DUFOSSÉ, 2006).

Pigmentos naturais são derivados de fontes como plantas, insetos e microrganismos. Eles têm ganhado maior atenção devido à estabilidade dos pigmentos produzidos, a segurança, a possibilidade de produção e a avaliação da tecnologia de cultivo para otimizar um maior rendimento. A preocupação é a produção de pigmentos por biotecnologia microbiana que apresentem matéria-prima viável e sejam independentes de condições climáticas. O uso de fungos filamentosos como fontes de corantes para alimentos têm uma longa história de uso no Oriente, porém ainda são proibidos no Ocidente, exceto a produção bem sucedida de  $\beta$ -caroteno pelo fungo *Blakeslea*. A maioria da literatura disponível sobre fungos produtores de pigmentos por alimentos fala sobre o *Monascus*, que produz pigmentos que são bons corantes devido à estabilidade na faixa de pH de 2 – 10, estabilidade ao calor à autoclavagem e por exibir diferentes cores (MAPARI *et al.*, 2005).

O gênero *Monascus* envolve três principais espécies (*M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber*) pertencendo à família *Monascaceae* e à classe *Ascomyceta*, cuja maior característica é a habilidade para produzir metabólitos secundários de estruturas policetílicas, algumas delas com pigmentação amarela, laranja e vermelha. Facilmente encontrados em muitos ecossistemas, esse fungo foi usado originalmente na China e Tailândia, para a preparação de *angkak*, um arroz de cor vermelho escura com vários usos encontrados, desde para conferir

cor para outros produtos como vinho, queijo e carne, até uso medicinal e conservador de carne (HAMDI *et al.*, 1997; BLANC, 1998; LIAN, WANG e GUO, 2005).

O processo tradicional é realizado em cultivo em meio sólido que é trabalhoso, demorado e requer maiores áreas. Então, técnicas de cultivo submersas para a produção de pigmentos de *Monascus* têm sido estudadas para minimizar os problemas de espaço, escala e controle de processos (EVANS e WANG, 1984). Rendimento de pigmentos em cultivo submerso é muito afetado pelas composições dos meios, fontes de nitrogênio, concentração de oxigênio e o valor inicial do pH no sistema (HAMDI *et al.*, 1997).

Compostos de carbono reduzidos são utilizados como fonte de carbono para formação de massa celular e formação de produto, atuando também como fonte de energia. Embora glicose seja freqüentemente adicionada como fonte de carbono existem outros compostos orgânicos (glicerol, lactose, etc.) que podem ser empregados.

O glicerol pode ser obtido como o principal resíduo da produção de biodiesel. O biodiesel é um combustível produzido a partir de fontes totalmente renováveis, especialmente quando tem como suas matérias-primas etanol ou metanol e um óleo qualquer de origem vegetal ou animal. De acordo com Parente (2003), o Brasil tem capacidade instalada de produzir anualmente 751,4 milhões de litros de biodiesel sendo as oleaginosas mais utilizadas como matérias-primas a soja, a palma, a mamona, o girassol, o dendê, entre outros. O crescente aumento na produção mundial de biodiesel gera, concomitantemente, um aumento considerável na disponibilidade do glicerol (cerca de 10 a 12% em relação à massa processada de óleos vegetais, por exemplo), podendo este ser purificado e utilizado pelos diferentes segmentos da indústria (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

Uma alternativa interessante para o aproveitamento do glicerol é a sua transformação via microbiológica, em metabólitos de interesse industrial. O glicerol tem sido empregado como fonte de carbono em vários processos biotecnológicos como: na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* (TEODORO, BAPTISTA-NETO e BADINO, 2003), na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (LEVINSON, KURTZMAN e KUO, 2007), na produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum* (OLIVEIRA *et al.*, 2003), na produção de 1,3-propanodiol por vários microrganismos (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000) e na produção de  $\beta$ -caroteno por algas *Dunaliella* spp. (SINGH e PHADWAL, 2003), entre outros.

Sendo assim, torna-se evidente a necessidade de pesquisas utilizando o glicerol para a obtenção de produtos de maior valor agregado e com características naturais. Diante disso, este trabalho teve como principal objetivo estudar a produção de pigmentos pelo fungo

*Monascus ruber* em cultivos submersos utilizando o glicerol como substrato. Estudou-se a influência da fonte de nitrogênio, do pH e da concentração de glicerol nos cultivos e realizou-se a otimização da produção de pigmentos vermelhos utilizando metodologia de superfície de resposta.

Este estudo está dividido em capítulos de acordo com as etapas realizadas. Cada capítulo apresenta uma introdução específica e a metodologia utilizada.

Os conceitos gerais estão apresentados no Capítulo 2. Foi realizada uma revisão bibliográfica apresentando a utilização de corantes, pigmentos naturais e artificiais, processos biotecnológicos, características do *Monascus*, a obtenção do glicerol e a sua utilização como substrato.

No Capítulo 3, estão descritos: o microrganismo, o material, os equipamentos e os meios de cultivo. Também estão descritos os métodos analíticos para a determinação da biomassa, dos pigmentos, do glicerol e da glicose e o cálculo dos parâmetros cinéticos.

No Capítulo 4 é apresentada a utilização do glicerol como substrato e a comparação com cultivos com glicose. Primeiramente, realizou-se um experimento para a determinação da velocidade de crescimento radial e pigmentação do *Monascus ruber* em placas com meios sólidos com diferentes substratos. A seguir, foram realizados cultivos submersos em frascos agitados a partir de glicerol e glicose adicionada de glicerol, que foram comparados com cultivos em glicose.

No Capítulo 5 são apresentados os estudos de cultivos utilizando glicerol como único substrato, variando a fonte de nitrogênio, a concentração de substrato e o pH para a máxima produção de pigmentos vermelhos.

No Capítulo 6 está apresentada a otimização da produção de pigmentos vermelhos a partir de glicerol como substrato utilizando metodologia de superfície de resposta e ferramentas estatísticas.

Por fim, no Capítulo 7 estão apresentados os resultados obtidos, as conclusões e as perspectivas para novos trabalhos.

## 1.2 OBJETIVOS

**O objetivo geral deste trabalho foi estudar a produção de pigmentos pelo fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802, utilizando glicerol como único substrato.**

Os objetivos específicos foram:

1. Verificar a utilização do glicerol (como substrato único ou adicionado de glicose) para a produção de pigmentos e comparar com a produção em cultivos com glicose.
2. Estudar o crescimento e a produção de pigmentos em cultivos contendo glicerol como substrato, variando os fatores fonte de nitrogênio, pH e concentração de glicerol.
3. Otimizar a produção de pigmentos vermelhos em cultivos utilizando metodologia de superfície de resposta, variando as concentrações de glicerol (substrato) e glutamato monossódico (fonte de nitrogênio).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

### 2.1 PIGMENTOS

#### 2.1.1 A cor

Cor é ainda a principal qualidade organoléptica que atrai os consumidores de alimentos, seguido pelo aroma. A coloração traz uma perspectiva saudável dos alimentos para os consumidores. Cor e aroma são os sinais que são imediatamente percebidos pelos sensores químicos e óticos dos seres humanos. Esses atributos determinam se o alimento é apetitoso. Alimentos com cores e aromas atrativos são usualmente traduzidos no aumento do consumo, que é a principal resposta de comportamento. Entretanto, cor e aroma são muitas vezes sensíveis ao calor, ao oxigênio, luz e acidez e ocorrem mudanças ou perdas durante o processamento e a estocagem. Corantes e aromas naturais derivados de plantas e químicos são usados pelas indústrias de alimentos para completar e algumas vezes aumentar as características originais (BABITHA, SOCCOL e PANDEY, 2006).

A cor dos alimentos é um atributo muito importante, pois a sua vivacidade está associada à qualidade e ao frescor e tem também influência sobre a percepção do gosto pelo consumidor. O aspecto estético dos alimentos afeta a sua aceitação. Uma composição agradável de cores é o sinônimo de atração. Os pigmentos mais importantes, responsáveis pelo aspecto atraente da refeição são: a mioglobina, nos alimentos de origem animal, a clorofila, os flavonóides e os carotenóides nos legumes (DUFOSSÉ *et al.*, 2005).

A manutenção da cor natural do alimento se constitui num fator fundamental para o marketing do produto em face da primeira avaliação do consumidor frente a este novo produto e, em consequência, o uso de corantes tem sido crescente na indústria de alimentos (SATO *et al.*, 1992). Duas classes bem distintas de corantes estão disponíveis para uso em alimentos, os sintéticos e os naturais.

### 2.1.2 Legislação Brasileira

De acordo com a Portaria SVS/MS 540/97, considera-se corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida).

Pela Resolução - CNNPA nº 44, de 1977 da ANVISA, os corantes são classificados em:

a) corante orgânico natural : aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado;

b) corante orgânico sintético: aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado;

c) corante artificial: é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais;

d) corante orgânico sintético idêntico ao natural: é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural;

e) corante inorgânico: aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento;

f) caramelo: o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão;

g) caramelo (processo amônia): é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Os corantes naturais permitidos para uso são: açafrão, ácido carmínico, antocianinas, cacau, carmim, carotenóides (alfa-caroteno, beta-caroteno, gama-caroteno, licopeno, bixina, norbixina), carvão, clorofila, clorofila cúprica, sal de amônio de clorofila cúprica, sal de potássio de clorofila cúprica, sal de sódio de clorofila cúprica, cochonilha, cúrcuma, curmina, hemoglobina, índigo, páprica, riboflavina, urzela (orceína sulfonada) e urucum, vermelho de beterraba, xantofilas (cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violaxantina).

Pela legislação atual através das resoluções n. 382 e 388 da ANVISA, no Brasil é permitido o uso de apenas oito corantes artificiais: amarelo crepúsculo, tartrazina, azul



brilhante, indigotina, bordeaux S (amaranto), eritrosina, ponceau 4R e vermelho 40. O Quadro 2.1 apresenta os corantes e a ingestão diária recomendada (ANVISA, 2007).

QUADRO 2.1 – Corantes sintéticos permitidos e a ingestão diária recomendada.

NOME	CEE	COR	IDA (mg/kg produto)
Amaranto (Bordeaux S)	E123	Magenta	0,50
Vermelho de eritrosina	E127	Pink	0,10
Vermelho 40	E129	Vermelho alaranjado	7,00
Ponceau 4R	E124	Cereja	4,00
Amarelo crepúsculo	E110	Laranja	2,50
Amarelo tartrazina	E102	Amarelo limão	7,50
Azul indigotina	E132	Azul royal	5,00
Azul brilhante	E133	Azul turquesa	10,0

Fonte: ANVISA, 2007.

### 2.1.3 Pigmentos naturais

A coloração de alimentos, como a de têxteis, existe há muito tempo. Durante séculos os corantes disponíveis eram os de origem animal (carmim), de vegetais (xantofilas, antocianinas, curcuminas) ou de minerais (óxidos de ferro). Em 1856, o químico britânico William Perkin obteve, pela oxidação da anilina, produto de destilação do índigo, um corante roxo capaz de tingir a seda. A partir desta data, os corantes naturais foram mais utilizados. Atualmente, vemos uma mudança de tendência: a coloração de alimentos é indispensável, agregando valor organoléptico aos alimentos, porém as indústrias se tornaram menos a favor das substâncias sintéticas. Com isso a lista de corantes naturais tende a aumentar devido à pressão de órgãos regulamentadores e dos consumidores contra os corantes sintéticos (BLANC, 1998).

Microrganismos e microalgas produtores de pigmentos são comuns na natureza. Entre as moléculas produzidas estão carotenóides, melaninas, flavinas, quinonas e mais especificamente monascinas, violaceínas, ficocianinas ou índigo. Entretanto, existe um longo caminho dos laboratórios até os mercados uma vez que somente cinco são produzidos em escala industrial. O mais antigo é o *angkak* ou koji vermelho, arroz transformado pelo fungo *Monascus*, usado na Ásia por séculos como colorante de alimentos para vinho de arroz vermelho, queijo de soja vermelho, produtos de carne e de peixes. A primeira história de

sucesso na Europa na produção de pigmentos por microrganismos foi a utilização do fungo *Blakeslea* para a produção de  $\beta$ -caroteno. O diretório geral para saúde e proteção dos consumidores da União Européia considera que o  $\beta$ -caroteno produzido por essa via é equivalente ao material sintetizado quimicamente e é aceitável para uso como agente colorante em alimentos. Entre as microalgas, existem duas histórias bem sucedidas para a produção eficiente de carotenóides, o  $\beta$ -caroteno usando *Dunaliella* e a astaxantina usando *Haematococcus* (DUFOSSÉ *et al.*, 2005). Em relação às ficobiliproteínas ou ficocianinas, existem alguns estudos como a utilização da alga *Spirulina* na obtenção de pigmentos azuis, antioxidantes e biomassa (MIRANDA *et al.*, 1998).

O uso de corantes de alimentos como aditivos na indústria de alimentos é um fator significativo para fabricantes de alimentos e consumidores na determinação da aceitabilidade dos alimentos processados. A União Européia, atualmente, autorizou aproximadamente 43 corantes como aditivos de alimentos, enquanto aproximadamente 30 aditivos corantes são aprovados para uso nos Estados Unidos. A legislação não distingue entre aditivos corantes sintéticos e naturais; entretanto, na Europa e nos EUA muitos dos aditivos colorantes listados são derivados de fontes naturais (Quadro 2.2) através de extração física e/ou química (MAPARI *et al.*, 2005).

Os corantes naturais, atualmente comerciais, possuem algumas desvantagens. Antocianinas são flavonóides e são caracterizados pela sua estrutura. As cores violeta e vermelha das antocianinas são sensíveis à oxidação, desbotam com dióxido sulfúrico e variam com o pH, limitando a sua aplicação em alimentos e bebidas ácidas. Também, betaninas, carotenóides e pigmentos de clorofila contêm hidrogênios lábeis e são facilmente descolorizados por oxidação, fazendo-os sensíveis à luz, calor e oxigênio. Essas características limitam a utilização desses aditivos de cor durante o processamento, estocagem e aparência dos alimentos em que foram adicionados. O cúrcuma é o maior pigmento de turméricos e leva um sabor apimentado que limita o seu uso como corante de alimentos (MAPARI *et al.*, 2005).

O fato de que corantes naturais são extraídos de fontes como cascas de frutas, sementes ou raízes, significa que a produção de corantes é dependente da disponibilidade dos materiais naturais para a extração da cor. A lista de pigmentos de fontes naturais é passível de variação e a extração de pigmentos é influenciada pelos métodos de extração empregados. Então, a composição química incluindo a presença de componentes e as propriedades de estabilidade dos corantes naturais variam entre as diferentes fontes de cultivo. O corante vermelho carmim é um extrato do inseto cochonilha fêmea e para produzir aproximadamente

100 g de carmim são necessários aproximadamente 14000 insetos. Isso indica um necessário incentivo para identificar vias alternativas para a produção de corantes naturais no futuro (MAPARI *et al.*, 2005).

QUADRO 2.2 – Corantes de alimentos naturais autorizados e suas maiores fontes.

Pigmentos	Fontes	Faixa de coloração	Código EU	Comentários
Antocianinas (flavonóide)	Cerejas, casca de uvas vermelhas, repolho-roxo	Rosa/vermelho a roxo/azul dependendo do pH	E163	A cor é dependente do pH, sensível ao calor e sujeito a oxidação
Betanina (Betalaína)	Beterraba vermelha	Rosa a vermelho	E162	Sensível ao calor, luz e oxigênio
Caramelo	Carboidratos de alimentos (Sacarose)	Marrom	E 150	Comumente utilizado como corante
Carbo medicinalis	Plantas, carvão vegetal	Preto	E153	De material de plantas queimadas, banido nos EUA
Carotenóides $\beta$ -caroteno*	Óleo de palma, cenouras	Amarelo a	E160a	Atividade da vitamina A faz dos carotenóides favoráveis do ponto de vista estético e nutricional. Exibem boa estabilidade ao pH na maioria dos alimentos, moderadamente solúveis em óleo, facilmente oxidáveis e possuem faixa de coloração limitada
Bixina ou norbixina	Sementes de urucum	Laranja	E160b	
Capsantina/capsorubina	Páprica	Laranja	E160c	
Licopeno	Tomate	Vermelho	E160d	
Luteína	Xantofila	Amarelo	E161b	
Cantaxantina	Salmão, camarão e flamingos	Dourado Rosa	E161g	
Clorofila	Vegetais verdes	Verde	E140	Sujeito à foto-oxidação
Clorofilina (complexo cúprico)	Vegetais verdes	Verde azulado	E141	Não usualmente nomeado “natural”
Curcumina	Cúrcuma (rizoma de plantas da Índia)	Amarelo-laranja	E100	Deve ser tratado para diminuir o odor e gosto apimentado
Riboflavina	Semi-sintético usando ribose produzida por processo bacteriano	Amarelo	E101	Verde fluorescente, sensível à luz e gosto amargo

\*  $\beta$ -caroteno e riboflavina são também produzidos pelo fungo *Blakesia trispora* e *Ashbya gossypi*, respectivamente. Fonte: MAPARI *et al.*, 2005.

Apesar do interesse a séculos pelos pigmentos naturais, o conhecimento sobre a sua distribuição, viabilidade e propriedades são limitados. No mundo, aproximadamente 70% de todas as plantas não foram investigadas completamente, e a composição química de apenas 0,5% foi estudada exaustivamente. Por outro lado, pelo menos 95% de todas as plantas existentes nos continentes norte-americano e europeu foram conhecidas e catalogadas. Levando em conta as várias desvantagens dos corantes naturais comercializados (instabilidade à luz, calor ou pH adverso), trabalhos na área de desenvolvimento de alimentos são necessários para encontrar fontes alternativas de materiais corantes de alimentos.

Apesar de os vegetais oferecerem diferentes cores, o número de pigmentos presentes em plantas é pequeno. A grande faixa de cores verdes em vegetais folhosos é produzida por diferentes combinações de clorofilas e carotenóides. A cor vermelha da maioria das frutas, como as cerejas, é produzida principalmente por pigmentos antocianinas. Poucos carotenóides, duas ficobilinas, a clorofila verde predominante e três flavonóides sazonais são os pigmentos mais abundantes em plantas e algas. Betalaínas, quinonas, alguns carotenóides e flavonóides e outra classe de pigmentos, incluindo fenalonas (curcumina), apresentam uma contribuição insignificante (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

#### **2.1.4 Corantes naturais x corantes artificiais**

Corantes são considerados essenciais na indústria de processamento de alimentos. A coloração dos alimentos favorece a apresentação dos alimentos e por isso é um importante fator na indústria de alimentos. Corantes de alimentos podem ser naturais ou sintéticos e geralmente não possuem valor nutricional. A maioria dos pigmentos naturais é extraída de plantas ou de produtos de plantas ou são produzidos por microrganismos. Uma vez que o número de corantes sintéticos está diminuindo devido aos indesejáveis efeitos tóxicos incluindo mutagenicidade e potencial carcinogênico, o foco no desenvolvimento de pigmentos para alimentos de fontes naturais está aumentando (SABATER-VILAR *et al.*, 1999).

A literatura é farta em apontar cuidados com a ingestão de corantes sintéticos, apesar do ainda grande uso deles pelos produtores de alimentos e bebidas processadas. Esses corantes são pigmentos ou tintas sintéticas do grupo azóico, sendo a maior parte delas sintetizada a partir do alcatrão do carvão mineral. Aproximadamente 20% da população são alérgicas a esses corantes artificiais. Em comum, trata-se de pessoas também alérgicas à

aspirina (ácido acetilsalicílico). Há estudos ainda que associam os corantes azo com casos de hiperatividade em crianças, urticária, indisposição gástrica e vômitos. A quantidade dos corantes sintéticos em produtos não é muito grande (em frações médias de 0,01%), mas preocupam os especialistas a frequência do expressivo consumo diário nos mais variados alimentos e bebidas, desde balas, laticínios, sobremesas até refrigerantes e sucos (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002; DUFOSSÉ, 2006; FURTADO, 2007).

As pesquisas nessa área, além de alertar sobre os limites de tolerância dos corantes permitidos, já fizeram vários sintéticos serem proibidos pela maior parte dos países. A publicação de estudos do Codex Alimentarius, já fundamentou a banição de alguns corantes por ministérios da saúde de todo o mundo, inclusive o brasileiro. Foram proibidos, por exemplo, o amarelo sólido, até então muito empregado em gelatinas; o laranja GGN, usado em pós para sorvetes; o vermelho sólido, para recheios e revestimentos de biscoitos; o azul de alizarina, corante em óleos emulsionados e gelatinas; e o escarlata GN, com uso em recheios de confeitarias. Tais proibições devem aumentar no futuro. Os Estados Unidos, onde apenas cinco sintéticos são permitidos, e o Japão já alertaram suas indústrias de que pretendem baní-los na próxima década. A Austrália e os países escandinavos também possuem leis restritivas aos corantes sintéticos e o mesmo deve ocorrer nos demais países europeus, que já dão preferência a produtos naturais (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002).

A legislação brasileira, atualizada com boa parte das leis internacionais e seguindo as recomendações multilaterais da FAO (Food and Agriculture Organization), permite apenas oito sintéticos (Quadro 2.3) e mais cinco sintéticos idênticos aos naturais (betacaroteno, beta-apo 8' carotenal, éster etílico do ácido beta-apo 8 carotenóico, riboflavina e xantofila). A permissão é condicionada à indicação nos rótulos sobre a sua condição sintética e sobre a ingestão diária aceitável (ANVISA, 2007).

QUADRO 2.3 - Os prós e contras dos sintéticos:

Tipo	Origem	Aplicações	Efeitos adversos
Amarelo crepúsculo	Sintetizado a partir da tinta de carvão e tintas azóicas	Cereais, balas, caramelos, coberturas e xaropes, laticínios, gomas de mascar	A tinta azóica, em algumas pessoas, causa alergia, produzindo urticária, angiodema e problemas gástricos
Azul brilhante	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e asma. Deve ser evitado por pessoas sensíveis às purinas

QUADRO 2.3 - Os prós e contras dos sintéticos (CONTINUAÇÃO):

Amaranto (Vermelho Bordeaux)	Sintetizado a partir de alcatrão de carvão	Cereais, balas, laticínios, geléias, gelados, recheios, xaropes, preparados líquidos	Deve ser evitado por sensíveis à aspirina. Este corante já causou polêmica sobre sua toxicidade em animais de laboratório, sendo proibido em vários países
Vermelho eritrosina	Tinta do alcatrão do carvão	Pós para gelatinas, laticínios, refrescos, geléias, etc.	Pode ser fototóxico. Contém 557 mg de iodo por grama de produto. Consumo excessivo pode causar aumento de hormônio tireoidiano no sangue, em níveis para causar hipertireodismo
Indigotina (azul escuro)	Tinta do alcatrão de carvão	Gomas de mascar, iogurtes, balas, caramelos, bebidas, etc.	Pode causar náuseas, vômitos, hipertensão e ocasionalmente alergia, com prurido e problemas respiratórios
Vermelho Ponceau 4R	Tinta do alcatrão de carvão	Frutas em caldas, laticínios, xaropes de bebidas, balas, cereais, refrescos e refrigerantes, sobremesas, etc.	Deve ser evitado por pessoas com sensibilidade à aspirina e asmáticos. Pode causar anemia e aumento da incidência de glomerulonefrite (doença renal)
Amarelo tartrazina	Tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, frutas, iogurtes, etc.	Reações alérgicas em pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Recentemente tem-se sugerido que a tartrazina em preparados de frutas causa insônia em crianças. Há relatos de casos de afecção da flora gastrointestinal
Vermelho 40	Sintetizado quimicamente	Alimentos à base de cereais, balas, laticínios, recheios, sobremesas, xaropes para refrescos, refrigerantes, geléias	Pode causar hiperatividade em crianças, eczemas e dificuldades respiratórias

Fonte: FURTADO, 2007.

Como resposta aos riscos e má fama dos sintéticos, os corantes naturais vêm ganhando espaço. Trata-se de uma conquista gradual, não maior por causa das vantagens competitivas dos sintéticos. Além da estabilidade bastante superior aos naturais, esses corantes artificiais

possuem maior capacidade tintorial, traduzida por um poder de melhor fixação nos alimentos, com cores mais intensas e menor custo, tanto por necessitar de dosagens menores como por seu preço direto inferior (SATO *et al.*, 1992).

Os desenvolvimentos de novos corantes englobam as principais famílias cromáticas dos corantes naturais: amarelo (curcumina, luteína, carotena); a laranja (urucum e páprica); vermelho (carmim, licopena, betanina e antociana) e verde (clorofila). Mas, de forma específica, prevaleceram nos cinco corantes naturais considerados de maior importância no mercado mundial: o urucum, a páprica, a cúrcuma, as antocianinas e o carmim de cochonilha (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Destacam-se ainda os esforços para tornar os corantes solúveis em água. Isso é possível com o encapsulamento dos corantes em bases de amido, gomas e gelatinas, tornando-os uma emulsão. Isso amplia o uso para outros produtos, tendo em vista que a maior parte deles, sobretudo os carotenóides e antraquinonas, são apenas lipossolúveis.

Muitos trabalhos foram publicados durante os últimos 10 anos sobre a produção, extração e propriedades dos pigmentos naturais de interesse para a tecnologia de alimentos. A previsão sobre os pigmentos naturais é considerada muito promissora para o futuro – quando apenas os aspectos tecnológicos são considerados. Os maiores obstáculos para a exploração dos novos corantes derivados de fontes naturais são: a legislação atual, que requer testes toxicológicos caros; custo de processamento (incluindo o cultivo ou produção biotecnológica) e aceitação pelos consumidores (de um material previamente não conhecido) (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

A notoriedade que os corantes naturais vêm assumindo deve-se não só à tendência mundial de consumo de produtos naturais, mas também às propriedades funcionais atribuídas a alguns desses pigmentos. O apelo mercadológico estimula cada vez mais o desenvolvimento de novos estudos com o intuito de superar as limitações tecnológicas existentes (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002).

### **2.1.5 Mercado de corantes naturais**

Em 1994, o mercado internacional de corantes naturais foi avaliado em US\$250 milhões de dólares, com US\$125 milhões pertencentes aos EUA. A indústria de corantes naturais para alimentos está apresentando um crescimento anual de 5-10% (comparados aos

3-5% dos sintéticos). Os líderes internacionais de corantes naturais são CHr. Hansen (Dinamarca), Warner-Jenkinson Europe Ltda (UK), Kalsec Inc. (USA) e Quest International (Holanda). A demanda por corantes naturais deve continuar. Produtores de balas, refrigerantes, bebidas alcoólicas, molhos para salada e laticínios são os que mais empregam os corantes naturais (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

### 2.1.6 Mercados de corantes no Brasil

Os alimentos tradicionalmente coloridos de forma artificial no Brasil são: balas, pós para refresco, pós para pudins, pós para sobremesa de gelatina, iogurtes, sorvetes e xarope de groselha, de grande consumo, principalmente, por crianças. Também, é utilizado na indústria de bebidas finas (SATO *et al.*, 1992).

A Figura 2.1 apresenta os atuais principais segmentos de mercado para os corantes.

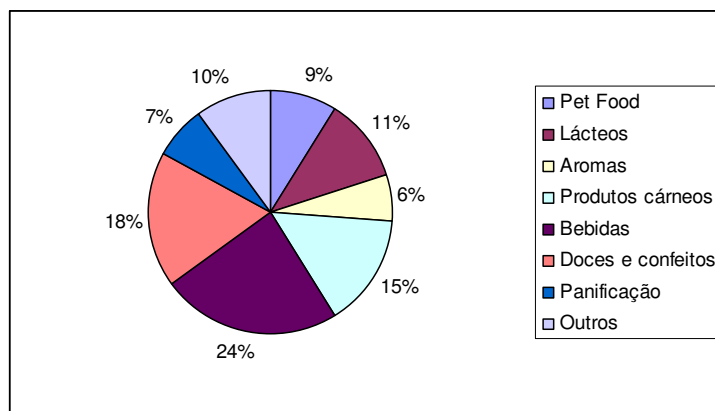


FIGURA 2.1 – Segmentos do mercado de corantes no Brasil em volume em 2007. Fonte: MANCZYK, 2007.

O mercado de corantes para a indústria de alimentos tem evoluído em consonância com o setor alimentício. Devido ao crescente interesse pelos corantes naturais, estão crescendo as pesquisas desses corantes no Brasil. As principais fontes de corantes naturais no Brasil são: urucum, cúrcuma, cochonilha de cactos e páprica (SATO *et al.*, 1992)

O Brasil é um grande mercado para os corantes e também um país promissor na obtenção de corantes naturais de diversas fontes, devido à sua grande biodiversidade.



### 2.1.7 Métodos de obtenção de pigmentos, via biotecnológica

A maioria dos precursores dos corantes químicos é geralmente derivada de produtos petroquímicos, um fato que aumenta a preocupação de consumidores quanto à segurança da ingestão por tempo prolongado dessas substâncias. É conhecido que o aumento da restrição dessas substâncias no futuro pode eliminar alguns dos corantes sintéticos aprovados. Conseqüentemente, é necessário encontrar fontes alternativas de corantes de alimentos. Um método alternativo é a produção de corantes de alimentos através de processos microbianos (EVANS e WANG, 1984).

A natureza é rica em cores e microrganismos produtores de alimentos e pigmentos (fungos, leveduras, bactérias) são comuns. Entre as moléculas produzidas estão carotenóides, melaninas, flavinas, quinonas e mais especificamente monascinas, violaceínas ou índigo (DUFOSSÉ, 2006).

A biotecnologia pode permitir a produção eficiente de corantes. Tecnologias de cultura dos tecidos e células de plantas, processos microbianos e manipulação genética são investigados para a produção de pigmentos. Entretanto, testes toxicológicos desses produtos devem ser requeridos antes de serem considerados seguros como aditivos de alimentos. Ainda, os pré-requisitos de investimentos significativos em Pesquisa e Desenvolvimento (P & D), bem como as facilidades de produção são obstáculos adicionais. Culturas do tecido da planta são consideradas um modo alternativo eficiente para a produção de pigmentos naturais. Carotenóides, antocianinas e betalaínas podem ser produzidos e acumulados em altos níveis em culturas de tecidos de plantas. Em contraste com as plantas, algas unicelulares e fungos são mais suscetíveis para produção biotecnológica porque eles podem ser cultivados usando técnicas de cultivo existentes (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

O sucesso de alguns pigmentos produzidos em cultivo depende da aceitabilidade no mercado, aprovação e do tamanho do capital requerido para investir, para levar o produto ao mercado. Alguns anos atrás existiam algumas dúvidas sobre a comercialização de pigmentos de alimentos derivados de processos biotecnológicos devido ao grande capital requerido para o investimento e as necessidades para facilitar o processo e os extensos estudos de toxicidade requeridos pelos órgãos reguladores (DUFOSSÉ, 2006).

QUADRO 2.4 – Produção microbiana de pigmentos

<b>Molécula</b>	<b>Cor</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Situação*</b>
Ankaflavia	Amarelo	<i>Monascus</i> spp. (fungo)	PI
Anthraquinona	Vermelho	<i>Penicillium oxalium</i> (fungo)	PI
Astaxantina	Vermelho-rosa	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (levedura) , <i>Phaffia rhodozyme</i>	ED
Astaxantina	Vermelho-rosa	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> (bactéria)	PP
Astaxantina	Vermelho-rosa	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (bactéria)	PP
Cantaxantina	Vermelho escuro	<i>Bradyrhizobium</i> ssp. (bactéria)	PP
Licopeno	Vermelho	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)	ED
Licopeno	Vermelho	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (fungo)	PP
Melanina	Preto	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i> (levedura)	PP
Monascorubramina	Vermelho	<i>Monascus</i> spp. (fungo)	PI
Naphtoquinona	Vermelho sangue	<i>Cordyceps unilateralis</i> (fungo)	PP
Riboflavina	Amarelo	<i>Ashbya gossypi</i> (fungo)	PI
Rubrolone	Vermelho	<i>Streptomyces echinoruber</i> (bactéria)	ED
Rubropunctatina	Laranja	<i>Monascus</i> spp. (fungo)	PI
Torularodina	Laranja-vermelho	<i>Rhodotorula</i> spp. (leveduara)	ED
Zeaxantina	Amarelo	<i>Flavobacterium</i> spp. (bactéria)	ED
Zeaxantina	Amarelo	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> (bactéria)	PP
$\beta$ -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)	PI
$\beta$ -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (fungo)	PP
$\beta$ -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Mucor circinelloides</i> (fungo)	ED
$\beta$ -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Neurospora crassa</i> (fungo)	PP
$\beta$ -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (fungo)	PP
Desconhecido	Vermelho	<i>Penicillium purpurogenum</i> (fungo)	ED
Desconhecido	Vermelho	<i>Paecilomyces sinclairii</i> (fungo)	PP

\* Produção Industrial (PI), estágio de desenvolvimento (ED), projeto de pesquisa (PP). Fonte: Dufossé, 2006.

Percepção pública dos produtos derivados da biotecnologia deve ser levada em conta. Atualmente alguns pigmentos para alimentos derivados de processos biotecnológicos estão no mercado (Quadro 2.4) e o marketing bem sucedido de pigmentos derivados de algas ou extratos de vegetais, como corantes de alimentos e suplemento nutricional, reflete na presença e importância de nichos de mercado em que consumidores querem pagar por “ingredientes totalmente naturais” (DUFOSSÉ, 2006).

Alguns pigmentos fúngicos promissores de importância comercial estão listados no Quadro 2.5 juntamente com a sua fonte. Eles exibem uma ampla faixa de coloração quando comparada com a faixa limitada de carotenóides, e como esses pigmentos são solúveis em

água, eles não requerem modificações químicas ou uso de veículos e estabilizantes para a dispersão em alimentos (MAPARI *et al.*, 2005).

QUADRO 2.5 – Alguns pigmentos fúngicos não-carotenóides promissores como corantes potenciais para alimentos.

Fonte	Pigmento	Cor	Comentários
<b>Ascomicetos</b> <i>Monascus spp.</i>	Monascorubrina Rubropunctatina Monascina Ankaflavina Monascusonas	Laranja Laranja Amarelo Amarelo Amarelo	Pigmento muito conhecido no Oriente, autorizado no Japão, estável ao calor e pH, forma pigmentos solúveis reagindo com aminoácidos no meio
<b>Ascomicetos Anamórficos</b> <i>Epicoccum nigrum</i>	Flavipina Orevactaena Desconhecido	Amarelo Laranja Amarelo	Solúvel em água, antioxidante, alto poder de coloração, estimula a produção de astaxantina em fungos
<i>Paecilomyces sinclairii</i>	Desconhecido	Vermelho em pH 3-4, violeta em pH 5-9 e rosa em pH 10-12	Estável à luz, alta produção em cultivo submerso, caracterização química necessária
<i>Penicillium herquei</i>	Atrovenetina	Amarelo	Antioxidante
<i>Roesleria hypogea</i> e <i>Penicillium atrovenetum</i>	Herqueinona Norherqueinona Outros	Vermelho Vermelho Verde azulado	
<i>Penicillium oxalicum</i> var. <i>armeniaca</i>	Arpink Red <sup>TM</sup>	Vermelho escuro	Estável ao pH e calor, patenteado em mais de 120 países
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Purpurogenona Mitorubrina Miturubrinol	Amarelo-laranja Amarelo Laranja a vermelho	Pigmento extracelular dependente do meio
<i>Penicillium persicinum</i>	Desconhecido	Rosa avermelhado	Grande quantidade de pigmento exógeno, ainda não caracterizado
<i>Penicillium fagi</i>	Desconhecido	Azul esverdeado	Presente no micélio, não-caracterizado

Fonte: MAPARI *et al.*, 2005.

Pigmentos microbianos são uma alternativa promissora em relação a outros aditivos extraídos de animais ou vegetais, porque eles são considerados naturais, não apresentam problema de sazonalidade e mostram grande produtividade. Entre os pigmentos produzidos por processos biotecnológicos, um dos mais importantes são os pigmentos de *Monascus*, que são utilizados por séculos como corantes de alimentos em países do oriente, e que apresentam potencial para uso em carnes, bebidas, sopas e molhos. Esses fungos produzem uma mistura de pigmentos entre os quais o vermelho é apontado como o mais importante (CARVALHO *et al.*, 2006).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DOS PIGMENTOS MONASCUS

### 2.2.1 Pigmentos Monascus

O aumento na preocupação no uso de agentes colorantes banuiu vários agentes colorantes sintéticos, que possuem um potencial carcinogênico e/ou teratogênico. Estas circunstâncias aumentaram inevitavelmente a demanda por agentes colorantes seguros e de ocorrência natural. Da qual um deles é o pigmento de *Monascus* (BABITHA, SOCCOL e PANDEY, 2006). O pigmento é na verdade uma mistura de policetídeos pigmentados de vermelho, amarelo e laranja. Eles são produzidos por uma via muito similar a biossíntese dos ácidos graxos e são insolúveis em soluções ácidas (EVANS e WANG, 1984).

Pigmentos Monascus é um grupo de metabólitos chamados azafilonas que possuem estruturas moleculares bem como propriedades similares às químicas. Ankaflavina e monascina são pigmentos amarelos, rubropunctatina e monascorubrina são laranja, e rubropunctamina e monascorubramina são vermelhos. As mesmas cores existem em duas estruturas moleculares diferindo no comprimento das cadeias alifáticas. Esses pigmentos são produzidos principalmente na célula (intracelulares). Eles possuem baixa solubilidade na água, são sensíveis ao calor, estáveis em pH de 2 a 10 e desbotam com a luz (BLANC *et al.*, 1995). Vários métodos foram patenteados para tornar os pigmentos solúveis em água. O princípio é a substituição de oxigênio em monascorubrininas ou rubropunctatinas por nitrogênio dos grupos amino de vários compostos como aminoácidos, peptídeos e proteínas, mudando a cor de laranja para vermelho (WONG e KOEHLER, 1981).

Pigmentos *Monascus* podem ser reduzidos, oxidados e reagem com outros produtos, especialmente aminoácidos, para formar vários produtos derivados nomeados de pigmentos complexados. Glutamil-monascorubrina e glutamil-rubropunctatina foram isolados de um cultivo submerso (HAJJAJ *et al.*, 1997).

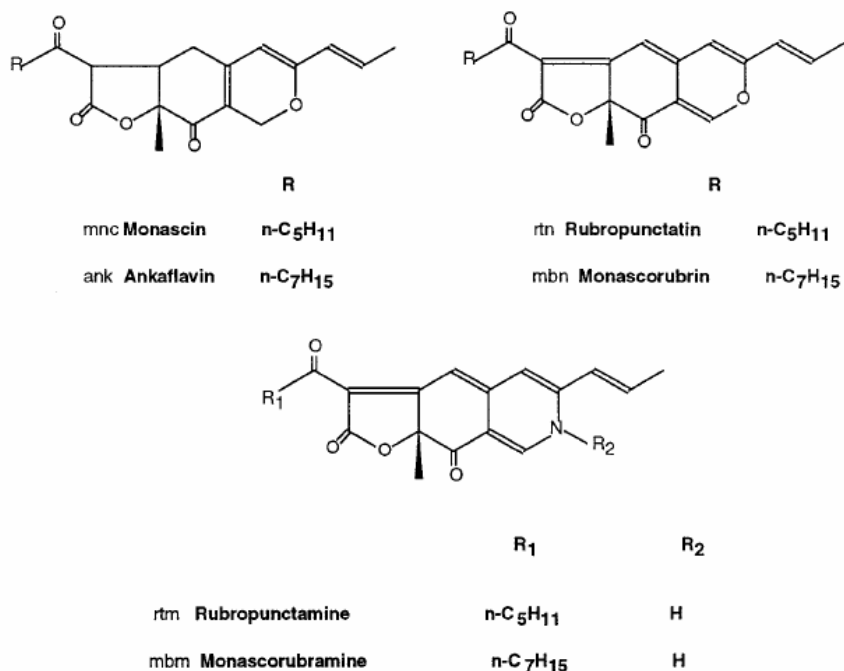


FIGURA 2.2 – Estrutura dos principais pigmentos formados pelo gênero *Monascus*. Fonte: HAJJAJ *et al.*, 1997.

Os pigmentos naturais de *Monascus* spp. melhoram a aparência e as características organolépticas dos alimentos. Ainda, ajudam a proteger a saúde dos consumidores limitando a quantidade de sal nos alimentos. É interessante também, o conhecimento da atividade bacteriostática desse pigmento natural e os seus efeitos sobre o colesterol (BARANOVA *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Uso e estabilidade dos pigmentos *Monascus*

*Ang-kak*, arroz adicionado de *Monascus* spp. (em forma de pó seco), é tradicionalmente utilizado para a coloração de alimentos, especialmente peixes, queijos e

bebidas alcoólicas na Ásia, porém está se tornando popular com produtores europeus de produtos cárneos como um agente de coloração para salame e molhos (LIAN, WANG e GUO, 2005).

Fabre *et al.* (1993) estudaram a utilização dos pigmentos em salsicha e patês e obtiveram bons resultados para a coloração e as características organolépticas, principalmente para a carne suína. Sendo os pigmentos, substitutos viáveis aos sais de nitrito e de nitrato para aumentar a coloração em produtos cárneos.

Lee e Chen (2002) descreveram algumas aplicações para o pigmento *Monascus*:

a) salsicha chinesa e bolinho cozido (*Bao*): um processo foi realizado para a salsicha e fabricação de *bao*, e foi concluído que os pigmentos de *Monascus* podem ser usados como corantes. Alta afinidade dos pigmentos para carne do que gordura é de particular interesse para os fabricantes;

b) macarrão instantâneo: uma indústria de macarrão avaliou os pigmentos de *Monascus* como corantes para o sabor e aroma, ingredientes do macarrão instantâneo, e encontraram que foi aceitável e não interferiu no aroma e sabor dos componentes;

c) produtos derivados do leite: leite e iogurte coloridos com pigmentos de *Monascus* spp. possuem coloração salmão. Os produtos foram estáveis por mais de um mês;

d) balas: o resultado foi desapontador. Os pigmentos não suportaram a alta temperatura (>150°C) empregada para fabricar as balas.

Outra aplicação foi citada por Sheu; Wang e Shyu (2000), que é a utilização do *Monascus purpureus* para a coloração de Nata, uma celulose bacteriana produzida por *Acetobacter aceti* spp. *xylinum* que possui potencial como alimento vegetariano. O complexo Pigmento-Nata foi estável a autoclavagem, acidificação e alcalinização.

Os pigmentos em arroz são também comercializados em cápsulas para a regulação de colesterol e prevenção de doenças como câncer, osteoporose e *Alzheimer*, devido à presença da substância lovastatina (ERDOGRUL e AZIRAK, 2004).

Como alguns pigmentos de *Monascus* spp. permanecem estáveis em temperaturas elevadas, luminosidade, oxigênio, íons metálicos e mudanças de pH, eles podem ser aplicados em carnes suínas, de aves e peixes e também em tofu para aumentar o aroma e o sabor e a preservação desses produtos. Também em queijos processados, o pigmento influenciou as características organolépticas e aumentou a qualidade desses queijos (BARANOVA *et al.*, 2004).

Mudanças na coloração de alimentos podem ser associadas com o tratamento térmico. Várias reações como destruição dos pigmentos (carotenóides e clorofilas) e reações de

escurecimento não enzimático (Maillard) podem ocorrer durante o aquecimento de frutas e vegetais degradando a coloração dos mesmos. A utilização destes pigmentos em alimentos e a monitoração do comportamento da degradação da coloração frente às condições em que são submetidos, como por exemplo, temperatura de processamento, temperatura de estocagem, tempo de estocagem e fatores ambientais, são pontos cruciais na avaliação de um pigmento que será utilizado em um determinado alimento, garantindo um padrão de qualidade e identidade para um determinado produto alimentício (WONG e KOEHLER, 1981).

Os pigmentos *Monascus* são razoavelmente estáveis a autoclavagem e em uma ampla faixa de pH. De acordo com Fabre *et al.* (1993), molhos ou patês coloridos com pigmentos vermelhos de *Monascus* apresentam uma cor residual de 92 a 98% após três meses a 4°C, com boa aceitação sensorial. Os pigmentos são, no entanto, instáveis frente à luz (apenas 20% de cor residual após 50 dias) e calor (45% de cor residual após 2 horas a 100°C). Esses pigmentos são mais estáveis em pH básico ou neutro.

Os pigmentos são instáveis em extremos de pH e temperaturas altas. Em pH mais alto (próximos à neutralidade) o pigmento é mais estável, devendo ser utilizado em aplicações em temperaturas inferiores a 60°C. A absorbância diminui mais rapidamente em valores de pH baixos. Esse efeito pode ser um problema para o uso de *Monascus* em alimentos ácidos, como iogurte. O efeito do pH pode ser devido à aceleração de interações com as moléculas de pigmentos, como por exemplo, o rompimento de uma ligação éster nos pigmentos rubropunctamina ou monascorubramina (CARVALHO *et al.*, 2005).

Serra *et al.* (2007) estudaram a estabilidade dos pigmentos *Monascus ruber* em meio de cultivo submerso e verificaram que o pigmento amarelo é aquele que tem maiores potencialidades de uso em processos alimentícios, pois a cinética de degradação dessa cor não sofre grandes alterações quando submetidos a temperaturas elevadas ou a meios fortemente ácidos. O pigmento vermelho foi o menos estável, com menor tempo de meia via, e a degradação da cor foi mais significativa do que para os pigmentos amarelos e laranjas. A constante de degradação dos três pigmentos aumentou com a diminuição do pH da solução e para valores de temperatura maiores nos intervalos de pH 4 a 7.

Também Wong e Koehler (1993), verificaram que os pigmentos vermelhos são menos estáveis que os amarelos, porém apresentam maior potencial.

De acordo com Carvalho *et al.* (2005), a perda de cor por degradação na indústria de alimentos é comum, justamente por se utilizar pigmentos naturais com frequência. Por isso, pigmentos *Monascus* continuam sendo um aditivo de cor promissor, mas é preciso considerar na formulação do produto que parte da cor pode degradar, dependendo das condições de

processo e do tipo de alimento. O pigmento é especialmente adequado para aplicação em alimentos refrigerados ou em bebidas alcóolicas, quando a degradação da cor é muito baixa.

O consumo anual de pigmentos de *Monascus* no Japão aumentou de 100 toneladas em 1981 para 600 toneladas em 1992 e foi avaliado em \$12 milhões de dólares de acordo com uma publicação em 1992. Novas aplicações em alimentos, como a coloração de carnes processadas (salsichas e presuntos), produtos marinhos como *kamaboko* (pasta de peixe), e *ketchup* de tomate, são descritos (HAJJAJ *et al.*, 1997).

## 2.3 MICRORGANISMO

### 2.3.1 Características do *Monascus*

O gênero *Monascus* é dividido em sete espécies denominadas *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floridans*, *M. pallens* e *M. sanguineus* (BLANC, 1998) e recentemente *M. mucoroides*. Porém, as espécies de maior significância para a indústria alimentícia são: *M. ruber*, *M. purpureus* e *M. pilosus*. *Monascus ruber van Thiehen* é um fungo que cresce na natureza em amido e está presente em numerosos alimentos. O organismo metaboliza celulose, maltose, frutose e glicose.

Facilmente encontrado em diversos ecossistemas, fungos do gênero *Monascus* são usados tradicionalmente em países orientais, originalmente na China e Tailândia, no preparo de um arroz de forte coloração vermelha e que encontra aplicações diversas, desde conferir cor a outros produtos como vinho, queijo e carne, até usos medicinais e também, como conservador de carne (WONG e KOEHLER, 1981). Enquanto alguns metabólitos do fungo são importantes devido à coloração, outros possuem atividade hipocolesterêmica e antimicrobiana, e vêm sendo estudados com mais intensidade na última década.

*Monascus ruber* é a espécie mais difundida do gênero encontrada na Europa onde é especialmente comum em silos e grãos em deterioração. Na Grécia, o fungo foi isolado recentemente da salmoura do processamento térmico de olivas verdes da variedade *Conservolea*. O fungo pode ser encontrado no solo onde os seus ascósporos podem permanecer viáveis por períodos de tempo extensos e contaminar frutas colhidas perto ou do solo (PANAGOU, KATSABOXAKIS e NYCHAS, 2002).



Ribeiro *et al.* (2003) isolaram o fungo filamentoso *Monascus ruber* de amostras de fubá no Brasil. Foi a primeira vez que esse fungo foi citado no Brasil.

Os principais metabólitos produzidos por *Monascus* são os policetídeos, que são formados pela condensação de um acetilcoA com uma ou mais malonylcoA com uma descarboxilação simultânea da síntese de lipídeos. Eles consistem nos pigmentos, monacolínes e em algumas condições, de uma micotoxina (BLANC *et al.*, 1995).

Estudos envolvendo cultivos submersos têm revelado que juntamente com a produção de pigmentos, *M. ruber* excreta uma micotoxina, chamada citrinina que possui propriedades antibióticas contra bactérias gram-positivas. Entretanto, as propriedades nefrotóxicas e hepatotóxicas dessa toxina comprometem o uso dos pigmentos vermelhos como corantes naturais de alimentos. Portanto, estudos bioquímicos e genéticos devem ser realizados para prevenir a formação de citrinina (BLANC *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que a biossíntese de citrinina origina da via tetracetídea em vez de pentacetídea como foi encontrado para o *Aspergillus terreus* e *Penicillium citrinum* (HAJJAJ *et al.*, 1999). Como os pigmentos são produzidos por via hexacetídea, isto sugere a existência de pontos de ramificação ao nível da via tetracetídea que pode contribuir para uma produção diferente de pigmentos e citrinina durante o crescimento de *M. ruber*. Entretanto, as enzimas que catalisam essas reações nessa junção ainda não foram caracterizadas (HAJJAJ *et al.*, 2000b).

Apesar de a via biossintética para os pigmentos vermelhos e a citrinina ser a mesma, a produção é diferentemente afetada pelos parâmetros nutricionais e ambientais. Agitação e aeração são parâmetros de grande influência no crescimento e produção de metabólitos secundários por *Monascus ruber*. Em condições de alta concentração de oxigênio, a produção de citrinina é favorecida, e uma relação linear foi observada entre o rendimento de citrinina e a concentração de oxigênio (HAJJAJ *et al.*, 1999). Em contraste, a síntese de pigmentos aumenta com o aumento da concentração de oxigênio em um perfil parabólico, ilustrando que a produção de pigmentos é inibida em culturas em condições anaeróbias (HAJJAJ *et al.*, 2000a).

A dose mínima de citrinina para que ocorram danos às funções renais é de 20 mg.kg<sup>-1</sup>. São utilizados 0,05 g do pigmento em pó em 100 g de carne embutida. Seria necessária, então, a ingestão de aproximadamente 35 toneladas de carne embutida por uma pessoa de 70 kg, para que ocorresse intoxicação através de produto obtido pela cepa *Monascus* spp. ATCC 16365 (MIYASHIRA, RODRIGUES e KILIKIAN, 2003).

Quando o *Monascus* começou a ser estudado sistematicamente, se acreditava que os biopigmentos produzidos apresentavam também propriedades antibióticas; mais tarde foi verificado que essa atividade é devida principalmente à outra substância, nomeada monascidin A. Estudos posteriores mostraram que essa substância é a citrinina. Porém, nem todas as cepas de *Monascus* a produzem. Foi verificado também que a fonte de nitrogênio utilizada pode interferir na produção da citrinina (BLANC *et al.*, 1995; HAJJAJ *et al.*, 2000a).

Fink-Gremmels *et al.*, 1991 apud CARVALHO *et al.*, 2005, mediram a atividade antibacteriana dos pigmentos *Monascus* depois de empregados em alimentos e o resultado foi uma ação inibitória contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Estes autores também estudaram em ratos os efeitos tóxicos e hipocolesterolêmicos dos pigmentos de *Monascus purpureus*, solúveis em metanol, (extraídos de *ankak*). Chegaram à conclusão de que os animais com hiperlipidemia induzida apresentaram redução dos níveis de colesterol total, colesterol HDL e de triacilglicerídeos plasmáticos. Não se observaram efeitos de toxicidade nos animais quando se usaram doses do extrato seco dos pigmentos de 5 a 10 g.kg<sup>-1</sup> do peso corporal.

Wang, Ju e Zhou (2005) verificaram que a produção de citrinina foi detectada em todas as culturas usadas no seu estudo com a maior concentração de 480 mg.L<sup>-1</sup> por *M. pallens* IMI 356820 e a mais baixa de 65 mg.L<sup>-1</sup> por *M. ruber* IFO 8201. Isso mostrou que a produção de citrinina não é restrita a apenas algumas espécies. Também foi observado que algumas cepas comerciais não continham citrinina ou apenas em um nível muito baixo. Isso indica que ambos os atributos genéticos e as condições de cultivo influenciam na produção de citrinina por cepas de *Monascus*. Apesar de não existirem evidências ligando *Monascus* a nefropatias ou outros efeitos adversos nos consumidores, precauções devem ser tomadas. Esforços devem ser realizados para identificar cepas não produtoras de citrinina e possíveis quebras da rota da síntese desta micotoxina.

Hajjaj *et al.* (1999) estudaram a adição de ácidos graxos em cultivos de *Monascus ruber*. Foi observado que a adição de alguns tipos de ácidos graxos, como o ácido octanóico, não tem efeito sobre o crescimento, porém pode ser considerado um método eficiente e barato para prevenir a produção de várias micotoxinas como citrinina, aflatoxinas e patulinas. Contudo, também depende da interação entre diversos fatores como concentração e tipo de substrato.

Também foi isolada uma substância denominada lovastatina em meios de cultivo sólido e submerso de *Monascus ruber*. A lovastatina também é conhecida por Mevinolina, Monacolina ou Mevacor e é um potente competitivo de uma enzima que limita a biossíntese

de colesterol. Ela é efetiva na hipercolesterolemia, sendo usada como produto medicinal. Foi primeiramente isolada de *Aspergillus terreus*. Várias cepas de *Monascus* e outros fungos filamentosos também são apontados como produtores dessa substância (CHAN *et al.*, 2002).

### 2.3.2 Morfologia do *Monascus ruber*

Os fungos *Monascus* pertencem à classe dos ascomicetos, chamados fungos superiores. Os fungos dessa classe apresentam várias aplicações, como em processos biotecnológicos, biossíntese de antibióticos e deterioração de alimentos. Os fungos são amplamente encontrados na natureza e são essenciais na degradação e reciclagem da matéria orgânica. Os fungos são capazes de produzir vários metabólitos, como nucleoproteínas, enzimas, polissacarídeos. (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984).

A capacidade enzimática, o potencial bioquímico e de adaptação às condições extremas dos fungos têm sido explorados para a produção de moléculas de interesse industrial (penicilinas, cefalosporinas), alcalóides, enzimas ( $\alpha$ -amilase, celulase), ácidos orgânicos (ácido cítrico) e pigmentos alimentares (ex. *Anka*) (HAJJAJ *et al.*, 2000b).

Colônias de *Monascus ruber* apresentam um crescimento relativamente rápido (5 dias) em meio PDA (Potato Dextrose Agar) à temperatura ambiente. São saprófitas do solo, suas colônias apresentam topografias levemente rugosas, circulares, flocosas, de coloração púrpura e de reverso também púrpura. Colônias de 20 a 30 mm de diâmetro em PDA, após sete dias. As colônias são planas, eventualmente com pequeno desenvolvimento aéreo, esparsas, com textura superficial floculenta, micélio inicialmente branco (1 a 2 dias), passando para laranja a vermelho pardo à medida que a cultura se desenvolve, com a formação de cleistotécios e aleurioconídias. Geralmente há formação de pigmentos solúveis que se difundem pelo ágar (PITT e HOCKING, 1999).

Quase todos os fungos, quando cultivados em condições favoráveis e abundância de carboidratos de fácil assimilação, crescem rapidamente formando abundante micélio, e quando as condições tendem a deter o crescimento por falta de nutrientes eles formam corpos de frutificação, ou estruturas de reprodução. A formação de estruturas de reprodução e sustentação é influenciada por outros nutrientes tais como: zinco, manganês e ferro, por exemplo. Assim sendo, é possível determinar as condições ótimas de crescimento e produção de pigmentos pelo fungo *Monascus*, monitorando as estruturas de frutificação e de

conidiação. Ou seja, em condições de limitação, observam-se cleistotécios, em condições de abundância de alimentos, conídios. Pode-se afirmar que a formação de pigmentos vermelhos ocorre na fase de limitação, e que o número de cleistotécios presentes indica a fase de início da formação de pigmentos vermelhos (MORITZ, 2005).

A existência de diferentes morfologias em fungos filamentosos, classificadas como hifas (filamentos dispersos), *clumps* (pequenos aglomerados) e *pellets* (aglomerados maiores e mais densos – grumos), e a possibilidade de formas distintas de crescimento, principalmente relacionados com as características de reprodução (assexuada – conídeos e sexuada – cleistotécio) induzem à formação de diferentes compostos de interesse industrial, como os pigmentos *Monascus* (HAMANO, OROZCO e KILIKIAN, 2005).

No estudo de Moritz (2005) ficou evidenciada a importância do acompanhamento da morfologia fúngica num processo de cultivo. A produção de pigmento *Monascus* está relacionada com a formação de estruturas de reprodução sexuada (formação de cleistotécios), assim, o acompanhamento microscópico destas estruturas aliadas ao controle de outros fatores importantes de cultivo (concentração de substrato, pH, aeração e frequência de agitação) pode ser utilizado como uma ferramenta de controle, podendo reduzir custos nas etapas do processo.

### **2.3.3 Fatores que influenciam o crescimento e a produção de metabólitos**

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelos microrganismos. Destaca-se a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais dos organismos envolvidos no processo. Assim, é preciso suplementar o meio de cultivo ou controlar os componentes que possam inibir o seu desenvolvimento, de modo a permitir uma rápida e eficiente conversão da fonte de carbono em produto (MORITZ, 2005).

Os pigmentos *Monascus* são tradicionalmente produzidos por processos biotecnológicos em estado sólido ou pedaços de pão ou arroz. Estudos envolvendo cultivos submersos têm aumentado recentemente (HAJJAJ *et al.*, 2000b). Os principais fatores que influenciam o crescimento e produção de pigmentos são: composição do meio de cultivo, temperatura, presença de oxigênio e aeração, pH, fonte de nitrogênio e umidade.

O cultivo tradicional de *Monascus* spp., visando à produção de pigmentos naturais utilizados em alimentos é realizado em meio semi-sólido, tendo arroz como substrato principal. Entretanto, fontes de carbono diversas vêm sendo usadas como substrato para o crescimento de *Monascus*, sendo as mais comuns a glicose, a sacarose e o amido. O melhor crescimento geralmente é observado em glicose (HAJJAJ *et al.*, 2000a).

A faixa de temperatura ótima para o crescimento de *Monascus* é 28 a 32°C, apesar da faixa de temperatura depender da cepa e varia na faixa de 25°C e 32°C. O crescimento é observado em uma ampla faixa de pH, de 2,5 a 8,0 com a faixa ideal entre 4,0 a 7,0 (CARVALHO *et al.*, 2005). Já a adição de uma fonte de nitrogênio apropriada facilita a liberação e solubilização dos pigmentos no meio em cultivos submersos (PASTRANA *et al.*, 1995).

## 2.4 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Os processos biotecnológicos são comumente classificados quanto à condução do processo, quanto à quantidade de água no meio e quanto à formação do produto e metabolismo energético. Quanto à condução do processo, podem ser descontínuos, contínuos ou semi-contínuos.

Os processos biotecnológicos, quanto a quantidade de água no meio, podem ser submersos (SmF – cultivo submerso) ou em estado sólido (FES – cultivo em estado sólido). O processo em estado sólido é normalmente definido como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos umedecidos, na ausência ou perto da ausência de água livre.

O processo em estado sólido possui algumas vantagens em relação ao cultivo submerso como: elevada produção (produto por volume de meio), baixos custos de operação e de investimento, além da simplificação dos processos de recuperação do produto de interesse. Dentre as desvantagens da FES destacam-se a dificuldade de se obter sensores para medir as variáveis como atividade de água, crescimento celular, a capacidade limitada para dissipar calor e outras dificuldades como transferência de oxigênio e nutrientes, reduzindo as taxas de crescimento, mas que, por outro lado, podem favorecer a síntese de metabólitos secundários (MIYASHIRA, RODRIGUES e KILIKIAN, 2003).

### 2.4.1 Produção de pigmentos *Monascus* em meio sólido/submerso

O cultivo tradicional de fungos do gênero *Monascus* para produção de pigmentos é feito em suporte de arroz, obtendo assim altas concentrações destes metabólitos secundários. Uma das condições para o sucesso do cultivo é a utilização de baixa umidade inicial no substrato (em torno de 25%), reduzindo o risco de contaminação e de aglomeração do substrato (JUZLOVA, MARTINKOVA e KREN, 1996).

O cultivo de *Monascus* tem sido realizado principalmente em meio sólido, entretanto o rendimento de produção é muito baixo para a produção em escala industrial. Para aumentar o rendimento de pigmentos, alguns pesquisadores têm focado em culturas submersas (EVANS e WANG, 1984, HAJJAJ *et al.*, 1997; PASTRANA *et al.*, 1995). Existem artigos abrangendo mutação de cepas, mudanças na composição dos nutrientes e mudanças nas condições físicas de cultivo. Técnicas de cultivos envolvendo *fed-batch*, imobilização por resinas poliméricas e cultivos semi-sólidos usando sacos de plásticos (Lotong) também foram desenvolvidas. Biorreatores para produção de pigmentos também são estudados, incluindo sistemas *air-lift* e fermentadores de garrafa (KIM *et al.*, 2002).

A utilização de técnicas de cultivo submersas, para a produção de pigmentos de *Monascus* tem sido estudada para minimizar os problemas de espaço, escala e controle de processos (EVANS e WANG, 1984).

## 2.5 GLICEROL

### 2.5.1 Características do glicerol

O glicerol é uma substância química que apresenta uma infinidade de aplicações, sendo utilizado na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia e química. Os processos de fabricação de glicerol são de baixa complexidade tecnológica, o que facilita seu uso, embora o seu custo ainda seja proibitivo para várias aplicações. As principais aplicações do glicerol se encontram na: (a) indústria química, como, por exemplo, insumo para a síntese de resinas, ésteres e plásticos, responsáveis pelo consumo de 18% do glicerol disponível; (b) indústria

farmacêutica, como componente de cápsulas, medicamentos, cremes e pomadas, onde seu consumo é de aproximadamente 7% do total; (c) em cosméticos, onde, por ser atóxico, não-irritante, insípido e inodoro, tem sido amplamente utilizado como emoliente e umectante em cremes para a pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens em geral, em aplicações que respondem por 40% de seu consumo; (d) indústria alimentícia, onde aproximadamente 24% do glicerol são utilizados na composição de umectantes e para conservar bebidas e alimentos, tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo, de carne e ração animal seca; e (e) em outros usos (aproximadamente 11%), como no processamento de tabaco, afim de, tornar as fibras do fumo mais resistentes e evitar o ressecamento das folhas na composição dos filtros de cigarros e como veículo de aromas. Na indústria têxtil, também é utilizado para amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

Glicerol é um produto químico muito utilizado que possui muitas aplicações comerciais. A produção atual de glicerol é em torno de 600.000 t/ano. O glicerol pode ser produzido por qualquer um dos três métodos principais: (a) o glicerol pode ser recuperado como co-produto em indústrias de óleos e gorduras. O resíduo gerado pelo processo de produção de sabão contém 8-15% de glicerol. A água resultante da hidrólise de gorduras contém pelo menos 20% de glicerol. (b) Glicerol pode ser sintetizado do propileno por uma variedade de métodos. (c) Glicerol pode ser produzido por processos biotecnológicos. Entretanto, não foram feitos maiores esforços para a produção do glicerol antes da Primeira Guerra Mundial. Nas décadas passadas, os avanços significativos em biotecnologia têm renovado o interesse na produção de produtos químicos de fontes de carboidratos, a chamada química verde (TAHERZADDEH, ADLER e LIDÉN, 2002).

O glicerol também é chamado de glicerina comercialmente ou 1,2,3 – propanotriol. O custo aproximado de 1 L de glicerol P.A. é de R\$ 14,00.

O Quadro 2.6 apresenta as constantes físicas do glicerol.

QUADRO 2.6 – Constantes físicas do glicerol

<b>Fórmula</b>	<b>(C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>)</b>
P.M.	92,11
P.E.	290°C
P.F.	20°C

O glicerol também pode ser obtido como o principal resíduo do biodiesel. A literatura mundial tem definido biodiesel como um biocombustível obtido a partir de uma reação

química denominada transesterificação, que é uma reação de um lipídeo com um álcool para formar ésteres e um subproduto, o glicerol (ou glicerina) (LIMA, 2005). A figura 2.3 mostra a reação simplificada de transesterificação de um triglicerídeo com etanol, resultando em combustível (biodiesel) e glicerol.

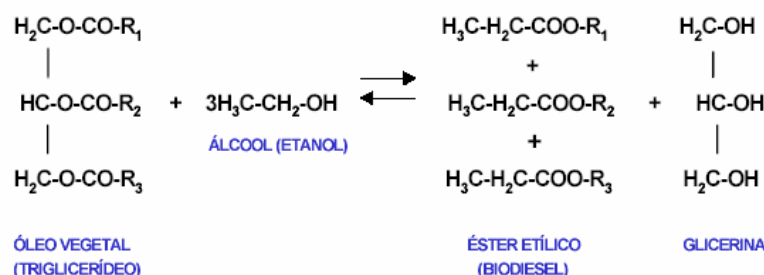


FIGURA 2.3 - Esquema simplificado de uma reação de transesterificação de um óleo vegetal.  
Fonte: COSTA NETO *et al.*, 2000.

O crescente aumento na produção mundial de biodiesel (ésteres alquílicos derivados de matérias graxas de ocorrência natural, como óleos vegetais e gordura animal) gera, concomitantemente, um aumento considerável na disponibilidade do glicerol (cerca de 10 a 12% em relação à massa processada de óleos vegetais, por exemplo), podendo este ser purificado e utilizado pelos diferentes segmentos da indústria.

A Europa e os Estados Unidos são, atualmente, os principais centros produtores de glicerol proveniente do biodiesel. Em 2000, a produção mundial de glicerol foi de 800.000 t e, no mesmo ano, a produção advinda do biodiesel (Europa e EUA) foi de 80.000 t/ano, sendo que, em 2002, essa produção atingiu cerca de 200.000 t/ano. A forte expansão que hoje se verifica na indústria de biodiesel poderá causar uma eventual redução no valor comercial da glicerina que, mais barata, poderá ser absorvida pelo mercado como insumo para uma variedade de aplicações até hoje não exploradas por razões fundamentalmente econômicas (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

Atualmente, as principais aplicações do glicerol são nas indústrias de cosméticos, sabões e farmácias, setores que são incapazes de absorver o volume de glicerina gerado com a produção do biodiesel. O aumento da glicerina disponibilizada no mercado brasileiro, com a implantação do B2 (2% de biodiesel no diesel), deverá ser de 60 a 80 mil toneladas/ano e com a introdução do B5 (5% de biodiesel no diesel), em 2013, a previsão é que esta produção aumente para 150 mil toneladas por ano (SOUZA; MELO e GONÇALVES, 2007). Apesar do glicerol dispor de aplicações no mercado de cosméticos, o aumento de sua oferta precisa ser



precedido de análise sobre aplicação em outros segmentos, o que pode configurar uma área específica de pesquisa, a gliceriquímica (OLIVEIRA e COSTA, 2002).

Em alguns países da Europa, onde o biodiesel foi adotado há mais tempo, o aumento significativo na produção de glicerol tem levado à queda dos preços, sendo inclusive responsável pelo fechamento de muitas das fábricas que produziam glicerina por via química. Algumas empresas européias também já apresentam problemas relacionados ao excesso de glicerol produzido, tendo que pagar para que seja feita uma disposição adequada do mesmo (DHARMADI *et al.*, 2006; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

A bioconversão do glicerol se tornará de interesse industrial, pois a glicerina se tornará uma substância abundante com o aumento na produção de biodiesel, e sua utilização como uma nova fonte de carbono para o crescimento microbiano é uma das possibilidades mais promissoras. O estudo de microrganismos que cresçam eficientemente em glicerol e produzam substâncias de interesse industrial, sua caracterização e identificação é uma importante etapa visando à descoberta de novas aplicações para o glicerol (SILVA e CONTIERO, 2007).

O investimento em pesquisas para novas aplicações do glicerol se faz necessário antes que maiores problemas ambientais comecem a ocorrer com o aumento na produção do biodiesel. Alguns produtos químicos atualmente obtidos através do petróleo poderiam ser produzidos através de cultivos com glicerol, beneficiando diretamente o meio ambiente ao mesmo tempo em que promove a inclusão social. A bioconversão do glicerol permitiria a obtenção de produtos biodegradáveis, contribuiria para reduzir a dependência pelo petróleo com a grande vantagem de utilizar uma fonte renovável. O desenvolvimento de processos para converter o glicerol, um composto de baixo preço, em produtos de alto valor, viria agregar valor ao biodiesel, contribuindo para o desenvolvimento das biorefinarias (DHARMADI *et al.*, 2006; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

A glicerina obtida a partir da transesterificação de óleo de colza por Bournay *et al.* (2005) se apresentou límpida e incolor. O conteúdo de glicerol no resíduo produzido foi de pelo menos 98%. Nem cinzas, nem compostos inorgânicos foram detectados na glicerina produzida. As principais impurezas da glicerina são a água, o metanol e os compostos orgânicos não - glicerol (MONG, tais como éster metílico). A alta qualidade do glicerol obtida indica que ele poderá ser utilizado em outros processos, o que caracteriza um parâmetro econômico importante.

### 2.5.2 Uso do glicerol em processos biotecnológicos

Uma alternativa interessante para o aproveitamento do glicerol é a sua transformação via microbiológica em metabólitos de interesse industrial ou em proteínas unicelulares que podem ser utilizados como concentrado protéico vitamínico na composição de rações animais. Glicerol pode também ser utilizado como fonte de carbono, sob condições aeróbias, por muitas espécies de leveduras, como a *Candida utilis* (NAVARRO, 1996).

Várias estratégias baseadas em transformações químicas e biológicas estão sendo propostas para converter o glicerol em produtos de maior valor. Conversões biológicas podem ajudar a driblar as desvantagens das catálises químicas (ex. baixa especificidade do produto, uso de alta pressão e/ou altas temperaturas, inabilidade para usar glicerol bruto com altos níveis de contaminantes, etc.), oferecendo uma oportunidade para sintetizar uma grande quantidade de produtos e funcionalidades. A um preço atual de (~2,5 centavos/lb), glicerol é muito competitivo com açúcares usados na produção de químicos e combustíveis, via processos microbianos (YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

O glicerol pode vir a ser uma fonte importante quando o biodiesel for aplicado em larga escala comercial no futuro próximo. Com a produção de 10 kg de biodiesel da esterificação de óleo de semente de colza, 1 kg de glicerol se torna disponível. O maior alvo das pesquisas envolvendo a valorização do glicerol através de processos biotecnológicos se refere à sua biotransformação em 1,3-propanodiol por várias cepas de bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Ao contrário, o número de investigações na utilização de glicerol como fonte de carbono por vários fungos e leveduras é restrito. A maioria desses estudos se refere à produção de biomassa e várias proteínas extracelulares e intracelulares por *Pichia* spp. Outras pesquisas indicam a produção de  $\alpha$ -amilase por *Yarrowia lipolytica* recombinante e biomassa e  $\alpha$ -caroteno por *Rhodotorula lactosa* (WANG, Z. *et al.*, 2001).

Tendo em conta que o volume bruto de produção projetado para o glicerol irá ultrapassar a atual procura comercial de glicerol purificado, e que as vendas de glicerol purificado para cosméticos e produtos farmacêuticos não será uma opção viável para a indústria de biocombustíveis, algumas utilizações alternativas para o glicerol deverão ser encontradas. Foi possível obter ácidos graxos a partir de cultivos da microalga *Schizochytrium limacinum*, utilizando o glicerol obtido da produção de biodiesel. Esse glicerol era de alta qualidade e favoreceu a produção dos ácidos graxos (CHI *et al.*, 2007). Também através de

processos biotecnológicos com glicerol obtido do biodiesel, foi possível obter ácido cítrico em cultivo submerso de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 (IMANDI *et al.*, 2007).

Como o aumento na oferta do biodiesel é simultâneo ao da oferta de outras substâncias resultantes (como glicerol e sabões), devem ser identificadas novas alternativas industriais para o emprego dessas matérias-primas. Deve-se coibir o possível aviltamento dos preços e manter o interesse do mercado sem expor a sociedade a riscos sanitários pelo aumento de resíduos, ou de mistura de subprodutos não especificados aos alimentos (OLIVEIRA e COSTA, 2002).

### 2.5.3 Biodiesel

Por definição, o biodiesel é um substituto natural do diesel de petróleo, que pode ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. Sob o aspecto químico, o biodiesel é um produto composto de ácidos graxos de cadeia longa, que se encontram ligadas a um álcool, sendo definido como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural (LIMA, 2005). Esse combustível é utilizado para substituição do óleo diesel, em percentuais adicionados no óleo diesel ou integral, nos motores à combustão de transportes rodoviários e aquaviários e nos motores utilizados para a geração de energia elétrica.

As matérias-primas vegetais são derivadas de óleos vegetais tais como soja, mamona, colza (canola), palma, girassol e amendoim, entre outros, e as de origem animal são obtidas de sebo bovino, suíno e de aves. Incluem-se entre as alternativas de matérias-primas os óleos utilizados em fritura (cocção) (COSTA NETO *et al.*, 2000). A Figura 2.4 apresenta o esquema de obtenção do biodiesel por transesterificação na presença de catalisadores.

A glicerina bruta, mesmo com suas impurezas convencionais, constitui um subproduto que pode ser comercializado. No entanto, o mercado é muito mais favorável à comercialização da glicerina purificada. Essa purificação pode ser feita por destilação a vácuo, resultando um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada. O produto da calda da destilação, ajustável na faixa de 10 - 15% da massa da glicerina bruta, é denominado “glicerina residual”, ainda encontra possíveis aplicações importantes (URIESTE, 2004).

Se os processos de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) forem otimizados, a produção de biodiesel pode ser obtida a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel (COSTA NETO *et al.*, 2000).

#### Fluxograma do Processo de Produção de Biodiesel

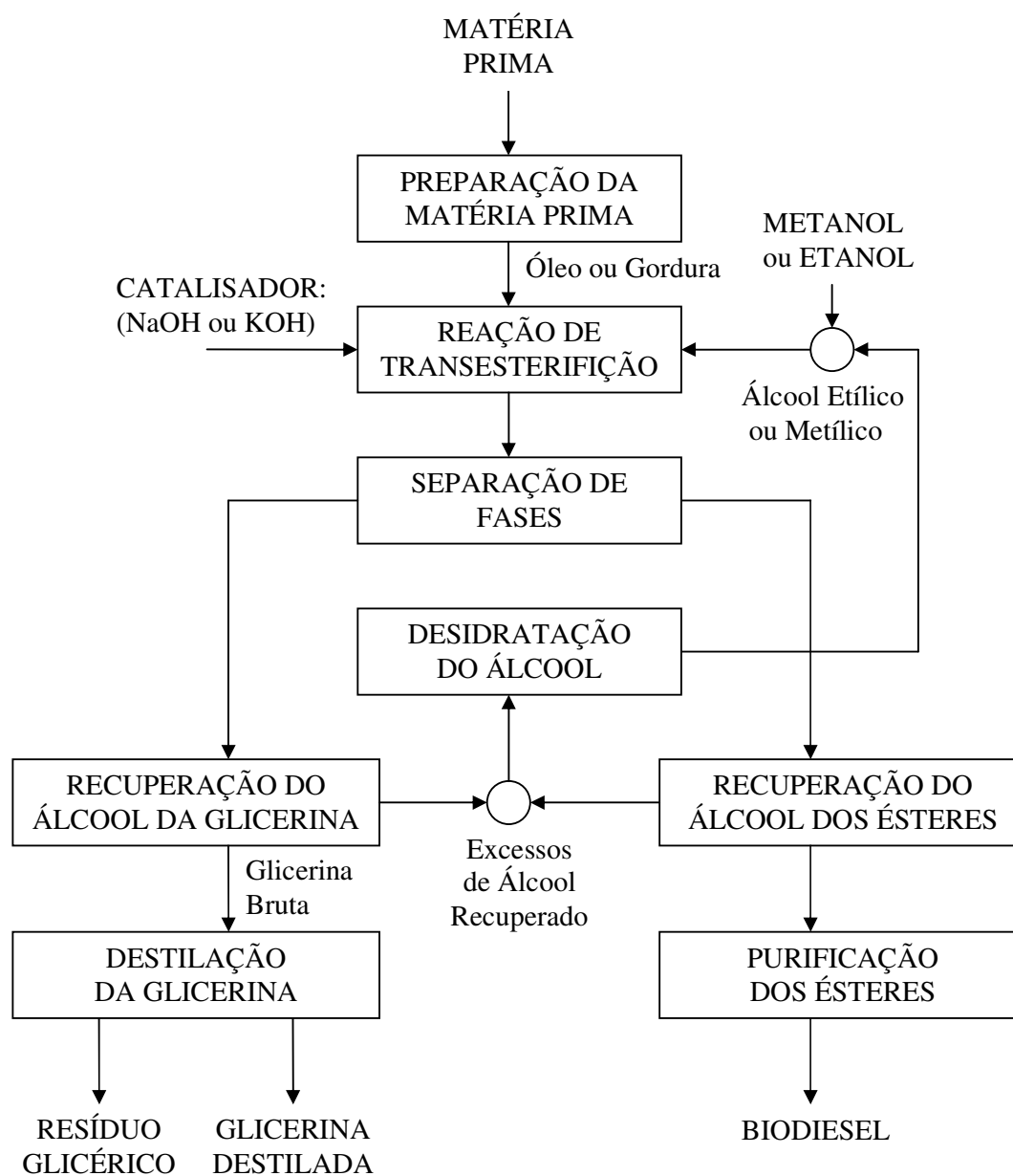


FIGURA 2.4 - Fluxograma do processo de obtenção do biodiesel. Fonte: PARENTE, 2003.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos nesse trabalho foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGE BIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC.

#### 3.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS

Os experimentos foram realizados em três etapas.

1ª etapa: avaliação da utilização de glicerol como substrato (único ou adicionado de glicose). Foram determinadas as velocidades de crescimento radial em placas com meio sólido e foi verificada a produção de pigmentos e o crescimento em cultivos em frascos agitados.

2ª etapa: testes em frascos agitados com diferentes fontes de nitrogênio (glutamato monossódico, glicina, uréia e sulfato de amônio), pH variando de 2,5 a 8,0 e cultivos com concentrações de glicerol de 10 a 60 g.L<sup>-1</sup>.

3ª etapa: otimização da produção de pigmentos vermelhos variando a concentração de glicerol e a concentração de glutamato monossódico utilizando metodologia de superfície de resposta.

#### 3.2 MICRORGANISMO

A linhagem de microrganismo utilizada foi a de *Monascus ruber* CCT 3802, um fungo filamentosso obtido da Fundação André Tosello (correspondente à cepa ATCC nº 36928), Campinas SP (*Monascus ruber* van Tieghem alt. *Basipetospora rubra* Cole & Kendrick).

Taxonomia: Filo *Eumycota*, Sub-filo *Ascomycotina*, Classe *Plectomycetes*, Ordem *Eurotiales*, família *Monascaceae*.

### 3.3 MEIOS DE CULTIVO

#### 3.3.1 Manutenção da cultura

A cultura foi mantida em tubos inclinados com meio PDA (Merck) para a conservação da cepa e para o repique. Após a incubação por 10 dias a 30°C, as culturas foram conservadas a 4°C em refrigerador e repicadas a cada quatro semanas.

#### 3.3.2 Inóculo

Multiplicação do fungo: Água estéril foi adicionada aos tubos contendo a cultura e transferida para garrafas de Roux contendo meio PDA (Merck). As garrafas foram então, incubadas a 30°C por 10 dias e armazenadas a 4°C.



FIGURA 3.1 – Cultura de *Monascus ruber* em tubos e em garrafa de Roux.

Inóculo: Foram transferidas aproximadamente 10 ml de água estéril para as garrafas de Roux contendo o microrganismo. A superfície foi raspada com alça de Drigalski e a suspensão obtida foi transferida para frascos de Erlenmeyer aletados de 1000 mL.

A composição do meio de cultivo para o inóculo está de acordo com o apresentado por Pastrana *et al.* (1995) com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose. A incubação foi realizada em shaker por 48 horas, sob frequência de agitação de 120 min<sup>-1</sup> e temperatura de 30°C.

### 3.4 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

O meio de cultivo sintético foi baseado nos estudos de Pastrana *et al.* (1995). Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose (Nuclear), 20; glutamato monossódico (Nuclear) ou glicina (Vetec), 5;  $K_2HPO_4$  (Vetec), 5;  $KH_2PO_4$  (Vetec), 5;  $CaCl_2$  (Vetec), 0,1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Synth), 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (Nuclear), 0,01;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (Vetec), 0,01 e  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (Ecibra), 0,03. Para os cultivos com glicerol P. A. (Nuclear), a glicose foi substituída por este.

Os ensaios foram realizados em frascos de *Erlenmeyer* aletados de 1000 mL contendo 400 mL de meio de cultivo. Para a retirada de amostras suficientes e devido aos frascos serem aletados, utilizou-se 400 mL de meio de cultivo. Os frascos foram incubados em *shaker* na temperatura de 30°C e agitação de 120 min<sup>-1</sup>.

#### 3.4.1 Preparo do meio de cultura e inoculação do fungo

As soluções de fosfatos, sulfatos e de cloreto férrico foram preparadas em frascos distintos, para evitar a complexação durante tratamento térmico. Todas as soluções e os meios de cultivo foram autoclavadas à temperatura de 121°C por 15 min.

Inoculação: Os frascos aletados de 1000 mL com 360 mL de meio de cultivo foram inoculados com 40 mL de inóculo de *Monascus ruber*. O pH inicial dos cultivos foi ajustado para 6,5 (PASTRANA *et al.*, 1995), utilizando soluções de NaOH e HCl.

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.5.1 – Determinação da concentração celular

A biomassa foi quantificada mediante gravimetria, sendo uma quantidade (10 mL) do meio de cultivo filtrada em papel filtro *Whatman* previamente pesado e o material submetido

à secagem em forno microondas durante 15 minutos em potência 2 (180 W) conforme metodologia apresentada por Orozco; Pereira e Kilikian (2003), obtendo-se a quantidade de biomassa retida em um volume de meio conhecido.

### **3.5.2 - Determinação do pH**

O pH foi determinado em pHmetro digital Analion.

### **3.5.3 - Determinação da concentração de pigmentos**

O pigmento vermelho foi quantificado em espectrofotômetro SP-1100 Séries Modelo SP-105 nos seguintes comprimentos de onda: 380 nm (pigmento amarelo), 420 nm (pigmento laranja) e 480 nm (pigmento vermelho) (HAJJAJ *et al.*, 2000a). Ainda foi definido por Hajjaj *et al.* (1998), que 1 unidade de absorbância  $UDO_{480}$  corresponde a  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  de pigmento.

### **3.5.4 - Determinação da concentração de glicose**

O método utilizado foi o com DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia proposta por Miller *et al.*, (1959), em espectrofotômetro SP-1100 Séries Modelo SP-105 a 540 nm e comparado com uma curva padrão de glicose na faixa de 0 a  $3 \text{ g.L}^{-1}$

### **3.5.5 - Determinação da concentração de glicerol**

O glicerol foi determinado por método espectrofotométrico descrito por Lambert e Neish (1950) apresentado por Araújo (2006), após reação com ácido periódico. Nesta reação,



o glicerol é oxidado quantitativamente a formaldeído, determinado em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro SP-1100 Séries Modelo SP-105.

### 3.5.6 – Parâmetros cinéticos

As velocidades específicas máximas de crescimento durante a fase exponencial foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo de acordo com a Equação 3.1.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\text{máx}} t \quad (3.1)$$

Sendo:

- X : biomassa ao longo da fase exponencial (g.L<sup>-1</sup>);
- X<sub>0</sub> : biomassa no início da fase exponencial (g.L<sup>-1</sup>);
- μ<sub>máx</sub> : velocidade específica máxima de crescimento celular (h<sup>-1</sup>);
- t : tempo (h).

A produtividade máxima em células (P<sub>células</sub>) foi calculada pela diferença entre a maior concentração celular (biomassa) em um instante t e a concentração celular (biomassa) inicial dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 3.2.

$$P_{\text{células}} = \frac{(X_{\text{MÁX}_t}) - (X_{t_0})}{t - t_0} \quad (3.2)$$

Sendo:

- P<sub>células</sub> : produtividade máxima de crescimento (formação de células) no instante de tempo (t – t<sub>0</sub>) (g.h<sup>-1</sup>);
- X<sub>MÁX<sub>t</sub></sub> : máxima formação de biomassa no instante de tempo t;
- X<sub>t<sub>0</sub></sub> : formação de biomassa no tempo t<sub>0</sub>;
- t : tempo para atingir o valor máximo biomassa;
- t<sub>0</sub> : tempo inicial do cultivo.

A produtividade máxima de produção de pigmentos foi calculada pela diferença entre a maior concentração de pigmentos (UDO) em um instante  $t$  e a concentração inicial de pigmentos dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 3.3.

$$P_M = \frac{(UDO_{MAX_t}) - (UDO_{t_0})}{t - t_0} \quad (3.3)$$

Sendo:

$P_M$ : produtividade máxima de formação de pigmentos no instante de tempo  $(t - t_0)$  (UDO.h<sup>-1</sup>);

UDO<sub>t</sub> : máxima quantidade de pigmento no instante de tempo  $t$ ;

UDO<sub>t0</sub> : quantidade de pigmento no tempo  $t_0$ ;

$t$  : tempo para atingir o valor máximo de UDO;

$t_0$  : tempo inicial do cultivo.

As velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos foram calculadas através da Equação 3.4, conforme metodologia proposta por Le Duy e Zadic (1973) apresentada por Schmidell *et al.* (2001).

$$\mu_p = \frac{1}{X} * \frac{dP}{dt} \quad (3.4)$$

Sendo:

$\mu_p$ : velocidade específica de produção de pigmentos vermelhos (UDO<sub>480nm</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>);

$X$  : biomassa (g.L<sup>-1</sup>) no instante de tempo  $t$ ;

$P$  : concentração de pigmentos vermelhos (UDO<sub>480</sub>);

$t$ : tempo (h);

As velocidades específicas de crescimento foram calculadas através da equação 3.5, conforme metodologia proposta por Le Duy e Zadic (1973).

$$\mu_x = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \quad (3.5)$$

Sendo:

$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ );

$X$  : biomassa ( $g.L^{-1}$ ) no instante de tempo  $t$ ;

$t$ : tempo (h).

Os fatores de conversão de substrato em células foram obtidos a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (biomassa) contra a quantidade de substrato, de acordo com as Equações 3.6 e 3.7.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.6)$$

$$Y_{X/G} = \frac{\Delta X}{\Delta G} \quad (3.7)$$

Sendo:

$Y_{X/S}$  : fator de conversão de glicose em biomassa ( $g.g^{-1}$ );

$Y_{X/G}$  : fator de conversão de glicerol em biomassa ( $g.g^{-1}$ );

$\Delta X$  : aumento da biomassa no intervalo de tempo  $\Delta t$  ( $g.L^{-1}$ );

$\Delta G$  : consumo de glicerol no intervalo de tempo  $\Delta t$  ( $g.L^{-1}$ ).

$\Delta S$  : consumo de glicose no intervalo de tempo  $\Delta t$  ( $g.L^{-1}$ ).

Os fatores de conversão de substrato em pigmentos vermelhos também foram obtidos a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (pigmento) contra a quantidade de substrato, de acordo com as Equações 3.8 e 3.9.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (3.8)$$

$$Y_{P/G} = \frac{\Delta P}{\Delta G} \quad (3.9)$$

Sendo:

$Y_{P/S}$  : fator de conversão de glicose em pigmento ( $UDO_{480}.g^{-1}$ );

$Y_{P/G}$  : fator de conversão de glicerol em pigmento ( $UDO_{480}.g^{-1}$ );

$\Delta P$  : aumento da concentração de pigmentos vermelhos no intervalo de tempo  $\Delta t$  ( $UDO_{480}$ );

$\Delta G$  : consumo de glicerol no intervalo de tempo  $\Delta t$  ( $g.L^{-1}$ ).

$\Delta S$  : consumo de glicose no intervalo de tempo  $\Delta t$  ( $g.L^{-1}$ ).

### 3.6 CRESCIMENTO RADIAL

No preparo do inóculo foram transferidas duas alçadas do microrganismo para tubos de ensaio contendo 0,3 mL de ágar 0,2% para evitar o espalhamento de esporos na superfície da placa durante a inoculação (GABIATTI JR *et al.*, 2004).

Foram estudados oito meios diferentes conforme apresentado por PASTRANA *et al.*, 1995. As concentrações de glicerol estudadas foram de 1, 2 e 3% e de glicose foi de 1%. Além das placas teste contendo glicerol ou glicose como fontes de carbono, foram realizadas medidas em placas contendo meio padrão: PDA (Potato Dextrose Agar), ágar e ágar+nutrientes.

Os meios, autoclavados, foram vertidos em placas de Petri. Após solidificados, fez-se uma inoculação pontual no centro da placa com o auxílio de uma ponteira estéril. Molhou-se a ponta da ponteira no inóculo e tocou-se no centro da placa contendo o meio. Incubou-se em estufa a 30°C e mediu-se, com auxílio de uma régua, o diâmetro da área recoberta pelo fungo. As medidas foram realizadas a cada 24 h.

Com a finalidade de se obter medidas confiáveis foram desenhadas três raias no fundo das placas de Petri. Foram medidos três diâmetros em cada placa, garantindo assim que as culturas que não apresentassem um crescimento regular tivessem calculado seus diâmetros médios. Os experimentos foram realizados em seis placas para cada meio de cultivo, e com os três valores dos diâmetros, calculou-se o diâmetro médio para cada tempo.

A velocidade de crescimento radial nos meios utilizados foi determinada pela declividade da reta obtida pela regressão linear, conforme a Equação (3.10).

$$r(t) = a + V_{cr} \cdot t \quad (3.10)$$

Em que:

$r(t)$  é o raio da colônia (mm);

$a$  é a constante da regressão linear,

$V_{cr}$  é a velocidade de crescimento radial (mm.h<sup>-1</sup>);

$t$  é o tempo de cultivo (h).

Análise estatística:

Para avaliação das velocidades de crescimento radial foi necessária a utilização de ferramentas estatísticas. A análise estatística utilizada para avaliar as diferentes velocidades de crescimento obtidas para diferentes meios constou do teste de comparação de declividade de retas proposto por Zar (1984) apresentado por Gabiatti Junior *et al.* (2003) e teste-t. O teste de comparação de declividades consiste na realização de regressões lineares para as curvas de crescimento radial em função do tempo. Neste teste é verificado se existe diferença significativa entre as declividades das curvas de regressão. Para isso é empregado o procedimento de análise de covariância. A base de cálculo necessária para comparar linhas de regressão para os tratamentos requer os valores:  $\Sigma x^2$ ,  $\Sigma y^2$ ,  $\Sigma x.y$  e o resíduo SS e DF para cada linha computada.

O teste para comparação de declividades das linhas de regressão compreendeu no cálculo do valor de F, dado pela Equação 3.11.

$$F = \frac{\frac{(SSc - SSp)}{(K - 1)}}{\frac{SSp}{DFp}} \quad (3.11)$$

Os valores de SSc, SSp e DF são dados pelas Equações 3.12, 3.13 e 3.14.

$$SSp = \sum_{i=1}^K SSi \quad (3.12)$$

$$SSc = \sum y^2 - \frac{(\sum x.y)^2}{\sum x^2} \quad (3.13)$$

$$DFp = \sum_{i=1}^K n - 2K \quad (3.14)$$

Sendo: n = tamanho da amostra para cada regressão;

K = número de regressões;

$\Sigma x^2$  = soma dos quadrados da variável independente da regressão linear;

$\Sigma y^2$  = soma dos quadrados da variável dependente da regressão linear;

$\Sigma x.y$  = soma do produto da variável dependente e independente;

SSc = resíduo para a regressão comum;

SSp = resíduo para a regressão ponderada;

DF = resíduo ponderado;

Se a hipótese de que todas as declividades das retas são iguais é nula, procede-se um teste de comparação múltipla a fim de determinar qual coeficiente angular da regressão de determinada população difere das demais.

Foi utilizado o teste-t para verificar a diferença entre cada par de declividades, utilizando o Software Statistica 6.0.

### 3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O meio de cultivo foi submetido à otimização visando maximizar a produção de pigmentos vermelhos, através de delineamento fatorial de metodologia de superfície de resposta. As variáveis estudadas foram: concentração de substrato (glicerol) e concentração de fonte de nitrogênio (GMS), em três níveis de variação ( $3^2$ ). A definição e os níveis estudados seguiram o delineamento estatístico experimental Box-Behnken conforme a Tabela 3.1.

O planejamento foi constituído por um grupo de ensaios com nove frascos mais uma repetição do ponto central, totalizando 10 frascos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para a análise estatística, análise dos efeitos, construção de superfície de resposta e teste-t, foi utilizado o software Statistica 6.0.

TABELA 3.1 - Variáveis e níveis de variação do delineamento  $3^2$ .

Variáveis decodificadas	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	10	40	70
Concentração de glutamato monossódico ( $\text{g.L}^{-1}$ )	1	5	9

## 4 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO SUBSTRATO PARA O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus ruber*

### 4.1 INTRODUÇÃO

O crescimento e a produção de metabólitos dos fungos do gênero *Monascus* se dão em condições diversas. Há vários meios de cultivo adequados, mas os mais comuns são PDA (potato dextrose agar) e MEA (agar extrato de malte). O crescimento se dá de 15-18°C (mínimo) e até cerca de 45°C (máximo), com a produção de pigmentos variando largamente com a espécie e com as condições de cultivo. Colônias de *Monascus ruber* apresentam um crescimento relativamente rápido (5 dias) em meio PDA à temperatura ambiente. São saprófitas do solo, suas colônias apresentam topografias levemente rugosas, circulares, flocosas, de coloração púrpura a marrom (PITT e HOCKING, 1999).

A maior característica dos fungos do gênero *Monascus* é a habilidade para produzir metabólitos secundários de estruturas policetílicas, algumas delas com pigmentação amarela, laranja e vermelha.

Os principais componentes dos seis pigmentos produzidos por espécies do gênero *Monascus* incluem: pigmentos laranja: monascorubrina e rubropunctatina, pigmentos vermelhos: monascorubramina e rubropunctamina e pigmentos amarelos: monascina e ankaflavina. Considera-se que o pigmento vermelho é produzido pela conversão química a partir do pigmento laranja, a elevados valores de pH, em presença de uma fonte apropriada de nitrogênio (BLANC *et al.*, 1995). A oxidação do pigmento laranja dá origem ao pigmento amarelo e os pigmentos vermelhos são produzidos pela aminação do pigmento laranja com unidades de NH<sub>3</sub>. Esses pigmentos são instáveis a pH extremos, luminosidade e temperatura e permanecem intracelularmente devido à alta hidrofobicidade, sendo eventualmente excretados no meio após reação com unidades de aminoácidos NH<sub>2</sub> (HAJJAJ *et al.*, 2000b).

Apesar dos outros pigmentos produzidos pelo *Monascus*, os vermelhos são considerados os mais importantes porque podem ser utilizados como substitutos dos nitritos em produtos cárneos (FABRE *et al.*, 1993).

Segundo Juzlova; Martinkova e Kren (1996), espécies de *Monascus ruber* produzem pigmento Monascus nos seguintes substratos: glicose, celobiose, maltose e frutose, mas não produzem este pigmento com a sacarose.

Moritz (2005) realizou um teste de assimilação de substratos (auxanograma) para o fungo *M. ruber*. Foi notado o crescimento em glicose, maltose, sacarose, galactose, rafinose, celobiose, trealose, adonitol, melobiose, xilose e arabinose. Ficou claro, neste estudo, que o fungo *Monascus* possui uma enorme capacidade de adaptação e assimilação das mais diversas fontes de carbono. Porém, nem todos os substratos favorecem a produção do metabólito desejável, o pigmento vermelho. Os testes de produção de corante em frascos agitados utilizando os substratos, onde foi observado crescimento, mostraram que o pigmento vermelho foi produzido, em quantidades expressivas ( $UDO_{480} > 0,7$ ), apenas nos meios contendo glicose, maltose e frutose.

Pisareva e Kujumdzieva (2006) verificaram a assimilação de várias fontes de carbono e a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus pilosus* e de uma cepa selvagem *Monascus* spp. C<sub>1</sub>, em cultivo submerso. Foram testadas maltose, glicose, lactose, rafinose e sacarose. Observou-se maior crescimento e maior produção de pigmentos em glicose, que é o substrato mais utilizado para a biossíntese de pigmentos e de biomassa.

Devido ao alto custo da tecnologia empregada na produção de pigmentos em uma escala industrial, é necessário o desenvolvimento de processos de menor custo para que a produção dos pigmentos possa substituir a produção de sintéticos (BABITHA, SOCCOL e PANDEY, 2006).

Existem estudos que relatam a utilização de substratos alternativos para a produção de pigmentos por *Monascus* spp., como etanol (HAMDI *et al.*, 1997) e resíduos. Os pigmentos vermelhos têm sido obtidos a partir de cultivos em meio sólido, de mandioca, farelo de arroz e aveia (BABITHA, SOCCOL e PANDEY, 2006) e de cultivos submersos de melaço de milho (HAMANO e KILIKIAN, 2006), farinha de trigo (DOMÍNGUEZ-ESPINOSA e WEBB, 2003), farinha de casca de camarão e caranguejo (WANG, S. *et al.*, 2002), suco de pêra (HAMDI, BLANC e GOMA, 1996) e de bagaço de uva proveniente da indústria de vinhos (SILVEIRA, DAROIT e BRANDELLI, 2008), entre outros.

A avaliação econômica do processo de produção de pigmentos vermelhos indica que o custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global de produção, podendo representar uma economia de mais de 30% no preço final do corante natural. O alto custo na produção de corantes naturais pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). No caso da produção de pigmentos vermelhos por *Monascus* spp. o custo do meio de cultivo é uma fração significativa, devido aos custos do produto e da purificação (HAMANO e KILIKIAN, 2006).



O crescente aumento na produção mundial de biodiesel gera um aumento considerável na disponibilidade do glicerol podendo este ser purificado. A forte expansão que hoje se verifica na indústria de biodiesel poderá causar uma eventual redução no valor comercial da glicerina que, mais barata, poderá ser absorvida pelo mercado, como insumo para uma variedade de aplicações e utilizado pelos diferentes segmentos da indústria. (GUIMARÃES *et al.*, 2005, FERNANDO *et al.*, 2007).

Portanto, estudos sobre a utilização do glicerol em processos biotecnológicos, vem a ser interessantes, uma vez que o glicerol se tornará um subproduto excedente quando o biodiesel for produzido em larga escala comercial (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000).

Dados bibliográficos relatando a produção de pigmentos *Monascus* utilizando glicerol como única fonte de carbono em cultivo submerso ainda não foram descritos, indicando que o estudo desse substrato é importante.

## 4.2 METODOLOGIA

O objetivo deste capítulo foi estudar a produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando glicerol como substrato. As velocidades de crescimento radial foram determinadas em diferentes substratos para a avaliação do crescimento e da produção de pigmentos. Realizaram-se também, cultivos em glicerol e/ou glicose para o estudo da produção de pigmentos em frascos.

Para o crescimento radial foram inoculadas placas com o inóculo de *Monascus ruber*. Foram estudados oito meios diferentes. Além das placas teste contendo glicerol ou glicose como fontes de carbono, foram realizadas medidas em placas contendo meio padrão: PDA (potato dextrose ágar), ágar e ágar+nutrientes. O diâmetro das colônias foi medido a cada 24 h e a velocidade de crescimento radial foi determinada pela declividade da reta obtida por regressão linear.

No estudo em frascos agitados foram testados quatro meios de cultivo contendo: fonte de carbono, fonte de nitrogênio e sais. A composição dos meios está de acordo com o apresentado por Pastrana *et al.* (1995), em que o glutamato monossódico foi substituído pela glicina.

Como fontes de carbono foram estudadas glicose e/ou glicerol (P.A.) em diferentes concentrações: Cultivo A (20 g.L<sup>-1</sup> de glicose), Cultivo B (15 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol), Cultivo C (5 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol) e Cultivo D (20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol).

Os ensaios foram realizados em frascos aletados de 1000 mL com 360 mL de meio de cultivo adicionados de 40 mL de inóculo. O pH inicial foi ajustado para 6,5 e amostras foram retiradas a cada 12 horas.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Determinação da velocidade de crescimento radial em diferentes meios sólidos

Nesta etapa foi avaliado se o glicerol é substrato para o crescimento e produção de pigmentos por *Monascus ruber*. Foram determinadas as velocidades de crescimento radial em placas com meio sólido contendo diferentes concentrações de glicerol, e comparadas com as velocidades em glicose, PDA e ágar.

A Tabela 4.1 apresenta as médias das leituras dos raios em milímetros, com seus respectivos desvios padrão para os diferentes meios.

TABELA 4.1 – Média dos resultados obtidos para as medidas dos raios (mm) para os diferentes meios.

Tempo (h)	Meio de cultivo							
	Glicose 1%	Glicerol 0,5%	Glicerol 1%	Glicerol 2%	Glicerol 3%	PDA	Agar	Ágar + Nutrientes
0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
24	1,0 ± 0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
48	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0	1,1 ± 0,2	2,8 ± 0,4	2,4 ± 0,5	1,0 ± 0
72	2,3 ± 0,8	2,4 ± 0,7	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,7	2,7 ± 1,1	4,4 ± 0,5	5,1 ± 0,5	1,6 ± 0,4
96	4,3 ± 1,2	4,6 ± 0,8	4,6 ± 0,6	4,4 ± 0,7	4,7 ± 0,9	5,9 ± 0,5	7,4 ± 0,5	2,3 ± 1,0
120	7,2 ± 1,3	7,1 ± 0,7	7,3 ± 0,5	7,2 ± 0,4	7,2 ± 0,9	7,4 ± 0,5	8,5 ± 0,8	4,3 ± 1,2
144	10,2 ± 1,3	9,4 ± 0,7	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,7	9,5 ± 1,0	9,2 ± 0,8	9,7 ± 1,3	6,6 ± 1,6
168	12,5 ± 1,4	11,4 ± 0,7	11,3 ± 0,6	11,3 ± 0,7	11,4 ± 0,9	10,9 ± 1,3	11,3 ± 1,7	8,2 ± 1,5
192	14,9 ± 1,2	13,3 ± 0,9	13,2 ± 0,6	13,3 ± 0,7	13,4 ± 0,9	12,8 ± 1,5	12,9 ± 2,1	9,7 ± 1,4
216	17,5 ± 1,1	15,0 ± 0,8	15,1 ± 0,5	15,2 ± 0,7	15,4 ± 1,1	14,6 ± 1,6	14,4 ± 2,4	10,3 ± 1,3
240	20,3 ± 1,2	16,8 ± 0,9	17,0 ± 0,5	17,4 ± 1,0	17,5 ± 0,9	16,8 ± 2,0	16,5 ± 2,4	10,8 ± 1,3
336	30,8 ± 1,3	24,3 ± 1,1	25,0 ± 0,7	24,7 ± 1,0	26,3 ± 0,8	24,5 ± 3,2	23,7 ± 2,3	11,9 ± 1,3
360	33,2 ± 1,4	26,0 ± 1,0	27,6 ± 1,2	26,6 ± 1,2	28,8 ± 1,1	26,5 ± 3,3	25,9 ± 2,3	12,1 ± 1,4
384	34,9 ± 1,7	27,6 ± 0,7	29,4 ± 1,3	28,8 ± 1,0	30,8 ± 1,2	28,1 ± 3,4	27,9 ± 2,1	12,3 ± 1,3

A Figura 4.1 apresenta as curvas onde o crescimento observado se aproximou da linearidade nos diferentes meios.

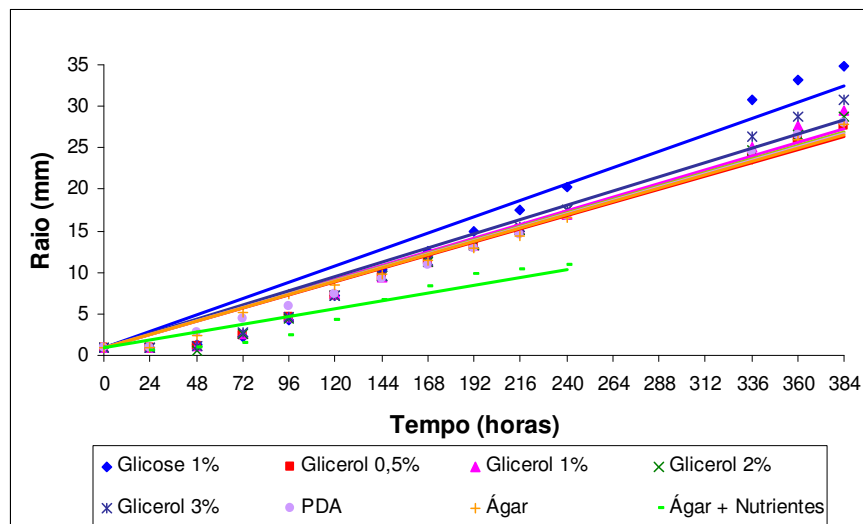


FIGURA 4.1 - Curvas de crescimento radial para o fungo *Monascus ruber*.

A velocidade de crescimento radial foi determinada através da Equação 3.6, onde o coeficiente angular da equação da reta representa esta velocidade. A equação do raio em função do tempo foi encontrada através da regressão linear dos resultados obtidos na Tabela 4.2. A Tabela 4.2 apresenta as equações de regressão com as respectivas correlações e velocidades de crescimento radial para o *Monascus ruber*.

TABELA 4.2 – Equação de regressão linear, coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e velocidade de crescimento radial  $V_{cr}$  para o fungo *Monascus ruber* em cada meio de cultivo.

Fonte de carbono	Equação de regressão	$R^2$	$V_{cr} (mm.h^{-1})$	$V_{cr} (mm.dia^{-1})$
Glicose 1%	$R = 0,0816t + 0,1$	0,94	0,0816	1,96
Glicerol 0,5%	$R = 0,066t + 0,1$	0,96	0,066	1,58
Glicerol 1%	$R = 0,0686t + 0,1$	0,96	0,0686	1,65
Glicerol 2%	$R = 0,0675t + 0,1$	0,96	0,0675	1,62
Glicerol 3%	$R = 0,0712t + 0,1$	0,96	0,0712	1,71
PDA	$R = 0,0668t + 0,1$	0,98	0,0668	1,60
Ágar	$R = 0,0665t + 0,1$	0,99	0,0665	1,60
Ágar + Nutrientes	$R = 0,0426t + 0,1$	0,87	0,0426	1,02

Com isso, aplicou-se a análise estatística para comparação de declividades de retas, proposta por Zar (1984). A partir dos resultados obtidos na Tabela 4.2, procedeu-se à análise de covariância, estando os resultados apresentados na Tabela A.1, Apêndice A.

O valor calculado para F, segundo a equação 3.11 foi:

$$F = 144,3.$$

Desde que  $F_{0,05,13,96} = 1,84$ , pode-se dizer que há diferença significativa entre as declividades das curvas ao nível de significância de 0,05, ou seja, existe diferença significativa nas velocidades de crescimento radial.

O Quadro 4.1 apresenta os resultados obtidos para o teste-t ao nível de significância 0,05 para identificação de quais amostras dos meios apresentam diferença significativa entre si para a velocidade de crescimento do *Monascus ruber*.

QUADRO 4.1 - Resultados obtidos no teste-t para diferenças de declividades de retas para as curvas de crescimento radial.

	Glicose 1%	Glicerol 0,5%	Glicerol 1%	Glicerol 2%	Glicerol 3%	PDA	Ágar	Ágar + Nutrientes
Glicose 1%								
Glicerol 0,5%								
Glicerol 1%								
Glicerol 2%								
Glicerol 3%								
PDA								
Ágar								
Ágar + Nutrientes								



Apresentam diferença significativa a um nível de confiança de 95%.

As figuras seguintes apresentam o crescimento, a morfologia e a produção de pigmentos pelo fungo *Monascus ruber* nos diferentes meios de cultivo.

Foi possível verificar que houve crescimento nas placas com meios teste contendo fonte de carbono e também nas placas contendo meios padrão, e que a formação de pigmentos variou conforme o meio.

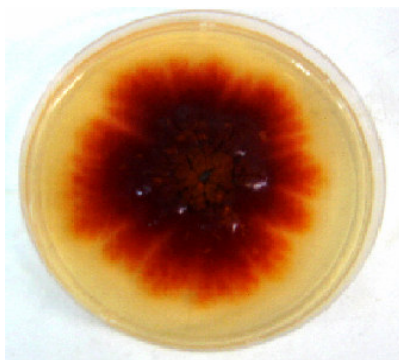


FIGURA 4.2 - Crescimento em meio PDA em 384 h.

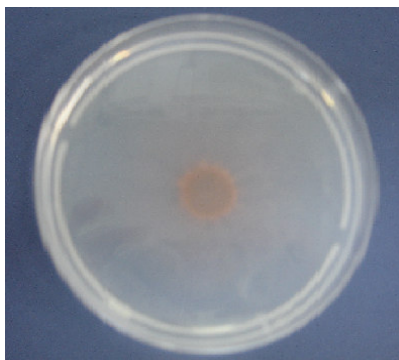


FIGURA 4.3 - Crescimento em ágar em 384 h.

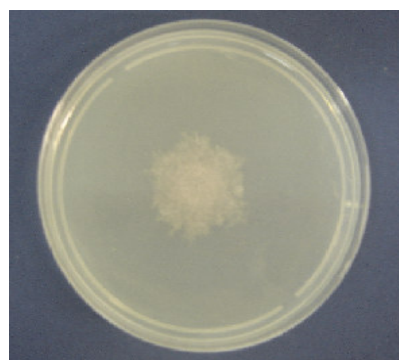


FIGURA 4.4 - Crescimento em ágar + nutrientes em 240 h.

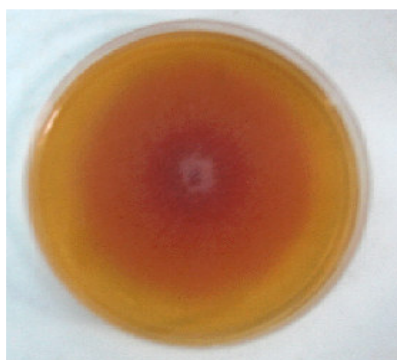


FIGURA 4.5 - Crescimento em meio glicose 1% em 384 h.

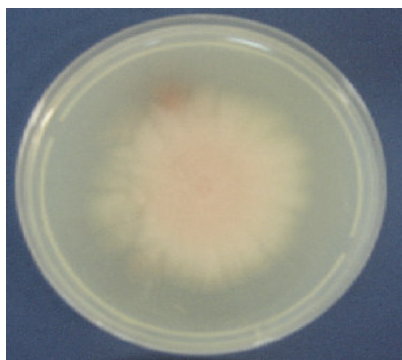


FIGURA 4.6 - Crescimento em meio glicerol 0,5% em 384 h.

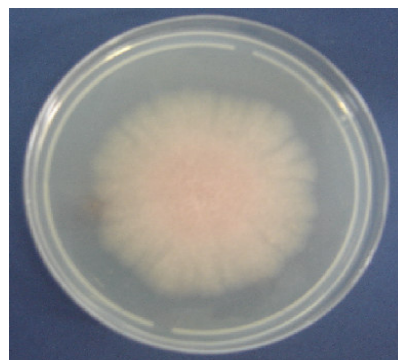


FIGURA 4.7 – Crescimento em meio glicerol 1% em 384 h.

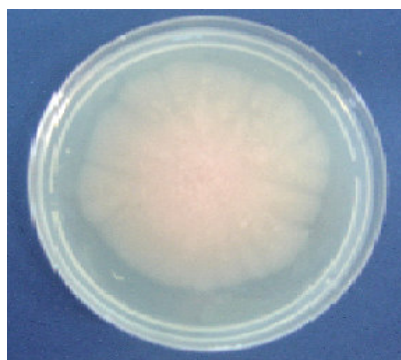


FIGURA 4.8 - Crescimento em meio glicerol 2% em 384 h.

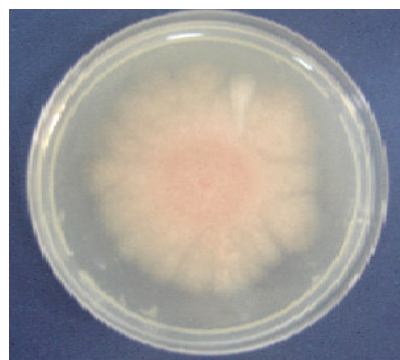


FIGURA 4.9 – Crescimento em meio glicerol 3% em 384 h.

A maior velocidade de crescimento radial observada foi de  $1,96 \text{ mm.dia}^{-1}$  e foi observada na placa contendo meio com glicose e solução de nutrientes. Nas placas com meios contendo glicerol e solução de nutrientes, a velocidade de crescimento radial variou de 1,58 a

1,71 mm.dia<sup>-1</sup>. Em placas com PDA foram observadas as características típicas de culturas de *Monascus* e o crescimento foi de 1,60 mm.dia<sup>-1</sup>, 18% menor que em meio com glicose.

As características típicas de culturas de *Monascus* em meio PDA são: colônias planas, circulares e flocosas, com pequeno desenvolvimento aéreo, micélio inicialmente branco, ganhando pigmentação ao longo do envelhecimento (do centro para a borda), pigmentação característica pardo-avermelhada, passando de laranja para vermelho pardo à medida que a cultura se desenvolve, com difusão de pigmentos solúveis pelo ágar (PITT e HOCKING, 1999; CARVALHO *et al.*, 2005; PISAREVA e KUJUMDZIEVA, 2006).

Carvalho *et al.* (2005) determinaram a velocidade média de crescimento radial de quatro linhagens de *Monascus purpureus* em meio PDA a 30°C. Para estas linhagens encontraram velocidades entre 2,3 e 3,1 mm.dia<sup>-1</sup>, velocidades maiores do que as encontradas para o *Monascus ruber*.

Através da análise estatística foi observado que as placas com os meios contendo glicose e glicerol, apresentaram diferença significativa de velocidade ao nível de 0,05. Ou seja, o crescimento foi maior nas placas com meio contendo glicose e diferiu significativamente das velocidades nas placas com meios contendo glicerol. Também a velocidade de crescimento radial nas placas com meio agar+nutrientes apresentou diferença significativa em relação às outras placas.

Nas placas com meios teste contendo glicose ou glicerol e solução de nutrientes, também foram observadas colônias planas, circulares e flocosas, com desenvolvimento aéreo e aumento da pigmentação com o tempo. Nesses meios foi observada pouca pigmentação. Contudo, nas placas com meio contendo glicose, o fungo apresentou maior coloração vermelha do que nas placas contendo glicerol, em que apresentou coloração rosada.

Pisareva e Kujumdzieva (2006) também estudaram a morfologia e o crescimento de *Monascus pilosus* em diferentes meios em placas de Petri. Foi testado um meio contendo 25% de glicerol, ágar, NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio e sais. A colônia apresentou coloração branca, formato plano e pouca formação de micélio aéreo. O maior crescimento foi observado em MEA (agar extrato de malte), com formação de colônias laranja de 26,25 mm de raio.

Nas placas contendo ágar e ágar + nutrientes não houve formação de pigmentos e o menor e mais limitado crescimento, 1,02 mm.dia<sup>-1</sup>, foi observado nas placas com meio que continha apenas a solução de nutrientes, indicando que uma fonte de carbono é essencial para o crescimento do *Monascus*.



### 4.3.2 Cinética de crescimento e produção de pigmentos utilizando glicose e glicerol como substratos em frascos agitados

Nesta etapa foi estudada a produção de pigmentos e o crescimento de *Monascus ruber* em cultivos submersos contendo glicerol e/ou glicose como fontes de carbono.

As Figuras 4.10 a 4.13 apresentam a cinética de formação de biomassa e de pigmentos em cada cultivo.

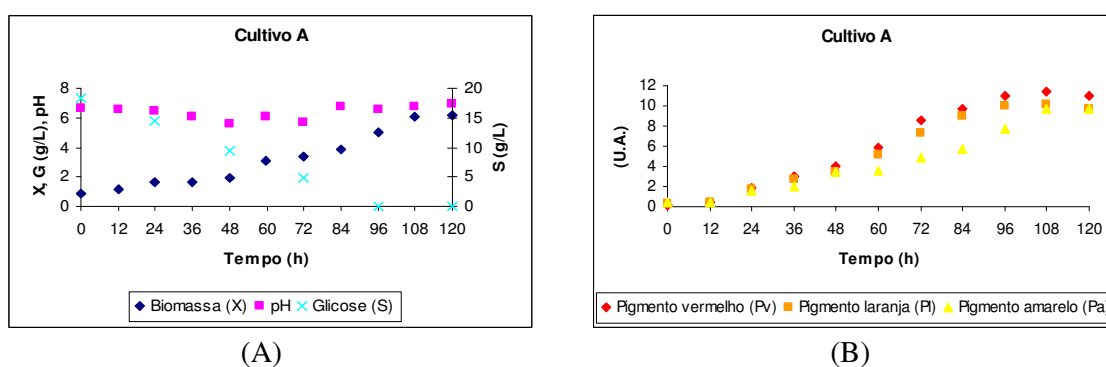


FIGURA 4.10 – (A) Evolução das concentrações de biomassa (X), pH e glicose (S) e (B) Evolução das concentrações de pigmentos (Pv, Pl, Pa), para o cultivo A (20 g.L<sup>-1</sup> glicose).

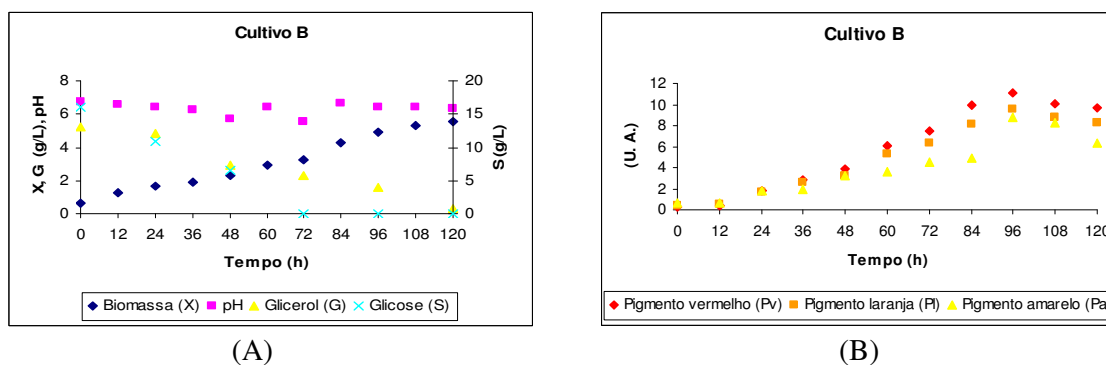


FIGURA 4.11 – (A) Evolução das concentrações de biomassa (X), pH, glicose (S) e glicerol (G) e (B) Evolução das concentrações de pigmentos (Pv, Pl, Pa) (B), para o cultivo B (15 g.L<sup>-1</sup> glicose e 5 g.L<sup>-1</sup> glicerol).

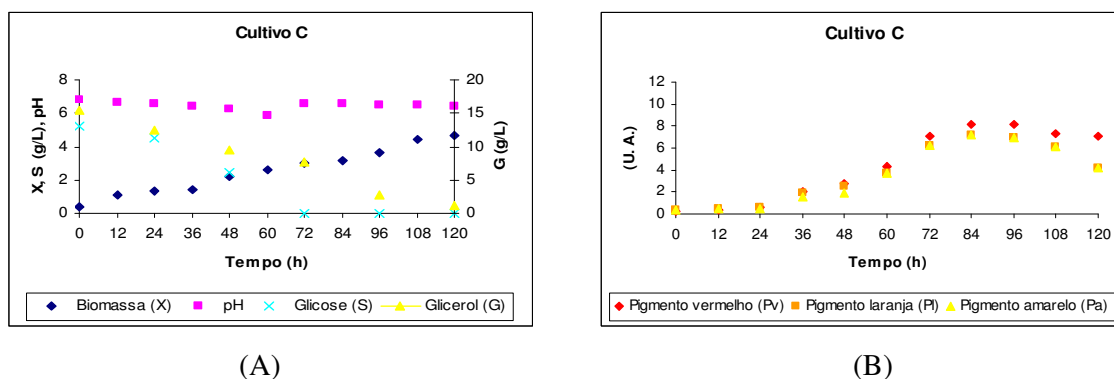


FIGURA 4.12 – (A) Evolução das concentrações de biomassa (X), pH, glicose (S) e glicerol (G) e (B) Evolução das concentrações de pigmentos (Pv, Pl, Pa), para o cultivo C ( $5 \text{ g.L}^{-1}$  glicose e  $15 \text{ g.L}^{-1}$  glicerol).

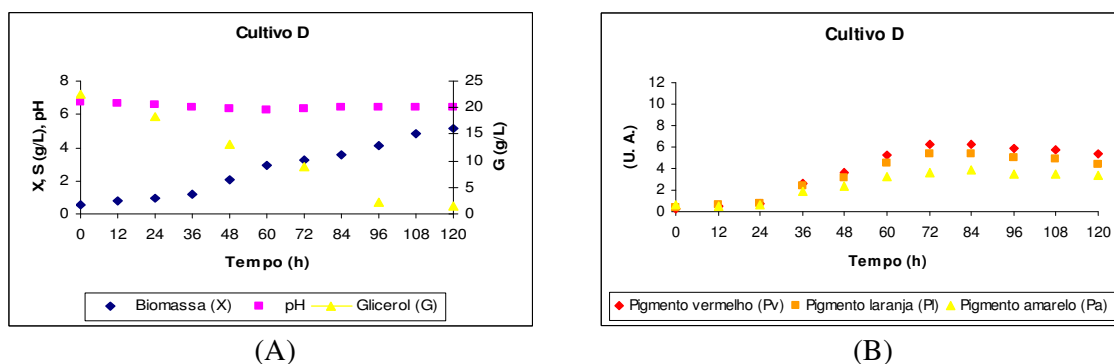


FIGURA 4.13 – (A) Evolução das concentrações de biomassa (X), pH e glicerol (G) e (B) Evolução das concentrações de pigmentos (Pv, Pl, Pa), para o cultivo D ( $20 \text{ g.L}^{-1}$  glicerol).

Analisando as figuras foi possível observar que houve maior produção de pigmentos vermelhos e de biomassa no cultivo A, contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. A produção máxima de pigmentos foi de  $11,5 \text{ UDO}_{480}$  em 108 horas de cultivo e de biomassa foi de  $6,15 \text{ g.L}^{-1}$  em 120 horas de cultivo. A menor produção de pigmentos vermelhos ocorreu no cultivo D, contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol, e foi de  $6,27 \text{ UDO}_{480}$  em 84 horas de cultivo e a biomassa foi de  $5,13 \text{ g.L}^{-1}$  em 120 horas de cultivo. Nos cultivos B e C, a máxima produção de pigmentos vermelhos foi de  $11,05$  e  $8,21 \text{ UDO}_{480}$ , respectivamente, com formação de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa.

Todos os cultivos apresentaram uma fase lag de aproximadamente 36 horas. Então, a fase de adaptação para os cultivos com glicose e glicerol foi a mesma, pois eles apresentaram a mesma fase lag. Os parâmetros que indicaram o final do cultivo foram a diminuição da

concentração de pigmentos e de biomassa e o aumento do pH, verificados após 108 h de cultivo.

Hajjaj *et al.* (1997) encontraram máxima produção de pigmentos de 13 UDO<sub>480</sub> e 5,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *Monascus ruber* em fermentador de 2L com concentração inicial de 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 5 g.L<sup>-1</sup> de GMS. O crescimento foi insignificante até 40 h de cultivo e aumentou até 110 h, antes do início da fase estacionária, concomitante com o consumo de glicose. A produção de pigmentos extracelulares foi proporcional à produção de biomassa e atingiu o maior nível, 13 UDO<sub>480</sub>, após 102 h de cultivo. A diminuição de 15% na concentração de pigmentos foi observada após o seu valor máximo ter sido alcançado.

Os resultados e o comportamento encontrados no cultivo realizado apenas com glicose concordam com os obtidos por Hajjaj *et al.* (1997).

Ocorreu uma diminuição na concentração de pigmentos extracelulares no final do cultivo. Essa perda pode ser explicada pela degradação fotoquímica dos pigmentos. Eles são estáveis por vários meses quando preservados em solventes orgânicos, enquanto em soluções aquosas, eles são degradados em poucos dias (PASTRANA *et al.*, 1995).

Hamano, Orozco e Kilikian (2005) realizaram ensaios com glicose e glutamato monossódico em frascos de 500 mL com diferentes cepas de *Monascus ruber* e obtiveram produção de pigmentos variando de 8 a 20 UDO<sub>480</sub>, com máxima produção de biomassa de 6 g.L<sup>-1</sup>.

O período para a máxima produção de pigmentos para o cultivo A, com glicose, foi de 108 horas e para o de glicerol de 84 horas. A produção de pigmentos no cultivo A foi máxima depois de 24 horas de o cultivo D ter apresentado máxima produção de pigmentos. De acordo com Pastrana *et al.*, (1995) que realizaram ensaios em frascos de 250 mL, utilizando glicose e GMS, o período ótimo de incubação foi de 92 h, que foi um período suficiente para a obtenção de uma boa produção de pigmentos antes do início da fase de declínio.

Foi possível verificar que a produção de pigmentos aumentou com o aumento da concentração de glicose inicial no meio de cultivo e que a formação de pigmentos está associada ao crescimento (HAJJAJ *et al.*, 1998; MORITZ, 2005).

Em todos os cultivos, o pH inicial foi de 6,5. Houve uma pequena diminuição do pH na fase inicial do cultivo, seguida de um pequeno aumento na próxima fase e permanecendo constante. Esse comportamento foi também observado por Teng e Feldheim (2001), em cultivos com *Monascus purpureus*. Dominguez-Espinosa e Webb (2003), observaram também uma diminuição do pH no início do cultivo. Quando os pigmentos foram excretados no meio, o valor do pH permaneceu igual ou um pouco superior ao originalmente ajustado (pH 6 - 7).

A Figura 4.14 apresenta os quatro cultivos e a Figura 4.15 apresenta a formação de pigmentos e biomassa nos frascos A e D após 120 horas de cultivo.



FIGURA 4.14 - Frascos aletados com os quatro cultivos após 120 h. Da esquerda para a direita, cultivo A, cultivo B, cultivo C e cultivo D.



(A)



(B)

FIGURA 4.15 - Formação de biomassa e pigmentos no cultivo A (20 g.L<sup>-1</sup> de glicose) (A) e Formação de biomassa e pigmentos no cultivo D (20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol) (B).

A partir das figuras pode-se observar a formação de biomassa e de pigmentos nos quatro cultivos. Houve grande formação de pigmentos e os cultivos apresentaram coloração vermelha. Também é possível observar a diferença de coloração dos cultivos com glicose e glicerol na Figura 4.15, sendo que a intensidade da coloração foi maior no cultivo com glicose.

A Tabela 4.3 apresenta os parâmetros cinéticos velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), pigmentos vermelhos (UDO<sub>480</sub>) e a produtividade máxima de pigmentos ( $P_M$ ) para os quatro cultivos.

TABELA 4.3 - Parâmetros cinéticos para os cultivos.

Parâmetro	Cultivo A	Cultivo B	Cultivo C	Cultivo D
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,018	0,015	0,011	0,018
Máxima produção de pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480}$ )	11,5	11,05	8,21	6,27
$P_M$ Pig. Vermelhos ( $\text{UDO}_{480\text{nm}} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0,10	0,10	0,09	0,07
$P_M$ Pig. Laranjas ( $\text{UDO}_{420\text{nm}} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0,09	0,09	0,08	0,06
$P_M$ Pig. Amarelos ( $\text{UDO}_{380\text{nm}} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0,09	0,08	0,08	0,04

A formação de pigmentos vermelhos foi maior no cultivo A, sendo seguida dos cultivos B e C e com menor produção de pigmentos no cultivo D.

As maiores velocidades máximas de crescimento foram observadas nos cultivos A e D, em torno de  $0,018 \text{ h}^{-1}$ , ocorrendo então, crescimento tanto em glicose quanto em glicerol. Já as produtividades médias de pigmentos vermelhos foram maiores no cultivo A que continha apenas glicose. No cultivo D, a produtividade média de pigmentos vermelhos foi 70% da no cultivo A. Houve maior produção de pigmentos vermelhos e menor produção de pigmentos amarelos e laranja em pH 6,5 nos quatro cultivos.

O cultivo B, contendo glicose ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e glicerol ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ), apresentou produção e produtividade de pigmentos vermelhos semelhantes ao cultivo A. Estudos indicam que cultivos com concentração de glicose variando de 15 a  $35 \text{ g.L}^{-1}$  não apresentam diferença significativa na produção de pigmentos vermelhos (PASTRANA *et al.*, 1995). Isso indica que o glicerol pode ser adicionado à glicose quando a concentração de glicose for de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , conforme o cultivo B.

A Tabela 4.4 apresenta os fatores de conversão de glicose em células ( $Y_{X/S}$ ) e de glicerol em células ( $Y_{X/G}$ ) e os fatores de conversão de glicose em pigmentos ( $Y_{P/S}$ ) e de glicerol em pigmentos ( $Y_{P/G}$ ) para os cultivos A e D.

TABELA 4.4 – Fatores de conversão para os cultivos A e D.

Fator de Conversão	Cultivo A ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ glicose)	Cultivo D ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ glicerol)
$Y_{X/S} (\text{g.g}^{-1})$	0,26	-
$Y_{X/G} (\text{g.g}^{-1})$	-	0,21
$Y_{P/S} (\text{UDO}_{480} \cdot \text{g}^{-1})$	0,61	-
$Y_{P/G} (\text{UDO}_{480} \cdot \text{g}^{-1})$	-	0,28

O cultivo A apresentou fator de conversão de 0,26, próximo ao valor encontrado para o glicerol (0,21). Já o fator de conversão de glicose em pigmentos vermelhos foi de 0,61, que

foi bem maior ao encontrado para o glicerol, que foi de 0,28. A transformação de substrato em pigmentos foi então, favorecida pela glicose.

O valor do fator de conversão encontrado por Hajjaj *et al.* (2000b) para cultivo com *Monascus ruber* a partir de 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose em 120 horas de cultivo foi 0,24 g.g<sup>-1</sup>, concordando com o valor obtido.

Os gráficos para o cálculo dos fatores de conversão e de  $\mu_{\text{máx}}$  estão apresentados no Apêndice B. A Figura 4.16 ilustra as velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos e a Figura 4.17 apresenta as velocidades específicas de crescimento para os quatro cultivos.

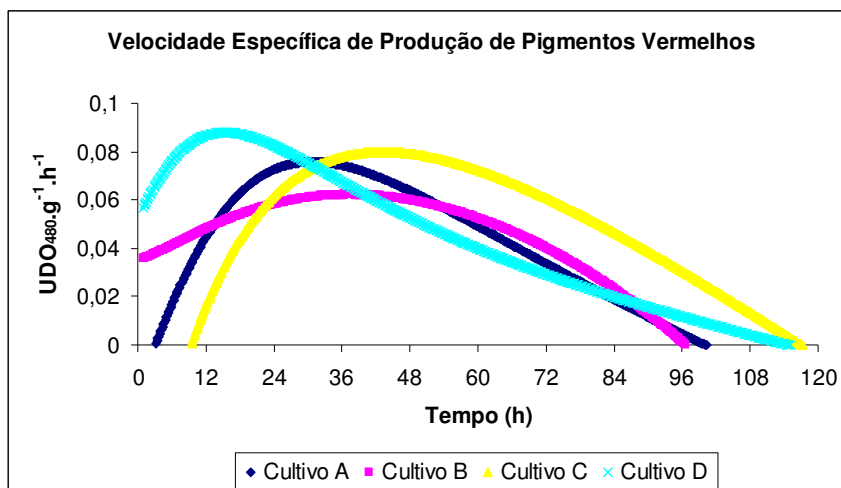


FIGURA 4.16 - Velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos para os cultivos.

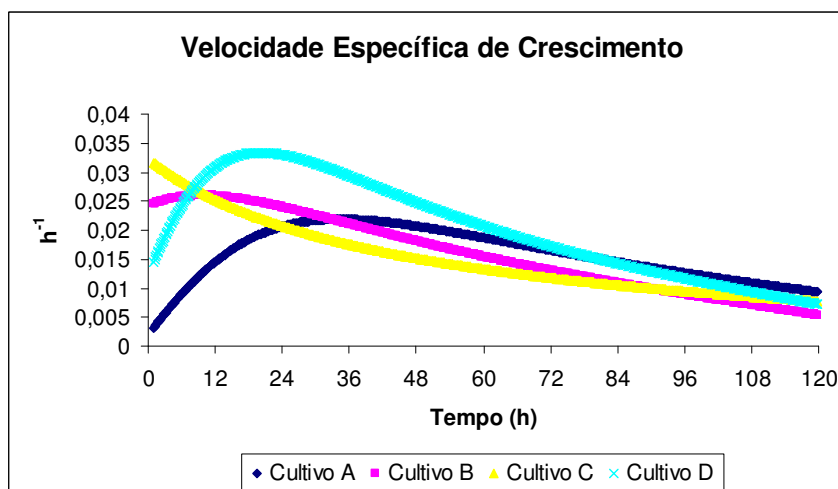


FIGURA 4.17 - Velocidades específicas de crescimento.

O cultivo D apresentou maiores velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos, em torno de  $0,09 \text{ UDO}_{480\text{nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Os outros cultivos apresentaram velocidades entre  $0,06$  e  $0,08 \text{ UDO}_{480\text{nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Ainda de acordo com Pastrana *et al.* (1995), a velocidade máxima de produção de pigmentos vermelhos encontrada em cultivos com *Monascus ruber*, foi em torno de  $0,08 \text{ UDO}_{480\text{nm}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Os valores obtidos para os cultivos concordam com esse valor.

O cultivo A apresentou velocidade específica máxima de crescimento de  $0,023 \text{ h}^{-1}$  em 36 horas e o cultivo D foi de  $0,034 \text{ h}^{-1}$  em 24 horas. Para Hajjaj *et al.* (2000b), a máxima velocidade específica de crescimento observada utilizando glicose foi de  $0,035 \text{ h}^{-1}$ . Esse valor foi observado no cultivo com glicerol.

Hamdi *et al.* (1997) estudaram a produção de pigmentos por *Monascus purpureus* em fermentador de 2 L a partir de etanol e de glicose. Observou-se que a glicose é mais favorável para a produção de pigmentos que o etanol. O que indica que a glicose é o melhor substrato para maior produção de pigmentos vermelhos por *Monascus*.

Contudo, a velocidade específica de produção de pigmentos foi maior no cultivo contendo apenas glicerol. Também a produção máxima no cultivo contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol foi atingida mais rapidamente, aumentando a produtividade de formação de pigmentos.

Isso indica que o glicerol constitui uma fonte alternativa para a obtenção de moléculas de maior valor agregado, como os pigmentos *Monascus*.

#### 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em placas com meio PDA ocorreu crescimento e a maior formação de pigmentos, já que é um meio próprio para o desenvolvimento deste fungo. A glicose possibilitou maior velocidade e formação de pigmentos na condição de crescimento em placas do que o glicerol. Também, houve menor formação de pigmentos em placas com meio contendo glicerol, porém este pode ser considerado substrato, pois foi metabolizado pelo fungo.

As velocidades de crescimento radial em placas contendo glicose ( $1,96 \text{ mm.dia}^{-1}$ ) e glicerol (média de  $1,65 \text{ mm.dia}^{-1}$ ) apresentaram diferença significativa. Houve maior crescimento e pigmentação em glicose. Em meio PDA as colônias apresentaram as características típicas com velocidade de crescimento radial de  $1,60 \text{ mm.dia}^{-1}$ .

As cinéticas de formação de biomassa e de pigmentos permitiram avaliar a utilização de glicerol e de glicose como substratos em cultivos submersos.

O glicerol possibilitou o crescimento e a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber*, sendo um substrato potencial devido à sua crescente disponibilidade. Os cultivos em glicose apresentaram os melhores resultados para a produção de pigmentos vermelhos ( $11,5 \text{ UDO}_{480}$ ) e produtividade ( $0,1 \text{ UDO}_{480}.\text{h}^{-1}$ ). Em cultivos com glicerol a produção foi de  $6,27 \text{ UDO}_{480}$ , com produtividade de  $0,07 \text{ UDO}_{480}.\text{h}^{-1}$ .

Entretanto, as velocidades de produção de pigmentos e de crescimento nos cultivos submersos foram maiores nos cultivos com glicerol ( $0,09 \text{ UDO}_{480}.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $0,034 \text{ h}^{-1}$ ). A máxima produção de pigmentos foi obtida em 84 horas de cultivo com glicerol e em 108 horas com glicose.

A biomassa formada permaneceu em torno de 5 a  $6 \text{ g.L}^{-1}$  nos cultivos. A partir dos cultivos com glicose e glicerol pôde-se concluir também que a adição de glicerol à glicose pode ser uma alternativa interessante.

O glicerol é um substrato potencial devido à sua crescente disponibilidade e pode ser utilizado para a obtenção de pigmentos *Monascus*. Contudo, maiores estudos são necessários para maximizar a produção de pigmentos solúveis em glicerol, como a influência do pH e da fonte de nitrogênio.



## 5 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS FONTE DE NITROGÊNIO, pH e CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM CULTIVOS UTILIZANDO GLICEROL COMO SUBSTRATO

### 5.1 INTRODUÇÃO

O interesse nos pigmentos vermelhos de *Monascus* spp. vêm crescendo nas indústrias de alimentos devido à sua grande aplicação em alimentos (carne, peixe, ketchup, licor, etc.) e também devido às substâncias normalmente utilizadas (sais de nitrito e nitrato) possuírem efeitos carcinogênicos e teratogênicos. Alguns pigmentos produzidos por *Monascus* spp., são intracelulares e insolúveis em água, porém as condições de cultivo (especialmente relacionadas com fonte de nitrogênio, pH e aeração) podem resultar na formação de pigmentos extracelulares e solúveis em água (HAJJAJ *et al.*, 1998; HAMANO, OROZCO e KILIKIAN, 2005).

Patentes têm focado principalmente na solubilização, estabilidade e extração em soluções de pigmentos. O pigmento reage rapidamente com grupos amino no meio, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos para formar pigmentos solúveis em água (HAJJAJ *et al.*, 1997). O uso de aminoácidos tem apresentado melhores resultados, seja como estimulante do acúmulo extracelular dos pigmentos, seja contribuindo para o aumento da produtividade de pigmentos vermelhos (PASTRANA *et al.*, 1995; HAJJAJ *et al.*, 1998).

Sais de amônio, especialmente nitrato de amônio, têm sido usados tradicionalmente como fonte de nitrogênio para produção de pigmentos vermelhos em cultivos em meio sólido. Entretanto, em estudos mais recentes, foi relatado que o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  é uma fonte pobre para produção de corantes quando comparado à adição de outros aminoácidos tais como, glutamato, histidina e glicina, principalmente em cultivo submerso (BLANC, 1998; HAJJAJ *et al.*, 2000a).

Blanc *et al.* (1998) estudaram a adição de diversos aminoácidos objetivando concomitantemente a redução da citrinina no meio de cultivo e a maximização da produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso. Em seus estudos, utilizaram dez diferentes aminoácidos (glutamato, glicina, alanina, valina, leucina, serina, histamina, triptofano, histidina e tirosina) concluindo que a utilização de glicina, histidina, serina e glutamato

adicionados ao meio de cultivo maximizam a produção de pigmentos vermelhos. Já a produção de citrinina é menor com a adição de glicina, histidina e serina.

A influência do pH do meio sobre a produção e excreção de pigmentos orgânicos por *Monascus* spp., também é citada por vários autores (CHEN e JOHNS, 1993; BLANC *et al.*, 1995; OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003; MORITZ, 2005).

Conforme Orozco, Pereira e Kilikian (2003), o pH do cultivo assume uma importância fundamental para a ativação de enzimas que participam do metabolismo secundário em fungos filamentosos. Variações no pH do meio de cultivo do gênero *Monascus* spp., alteram a proporção entre os diversos pigmentos produzidos e também a sua liberação no meio (principalmente dos pigmentos vermelhos). O melhor valor para a fase de crescimento é em torno de 5,5 e para a produção de pigmentos em torno de 6,5. A mudança do pH de cultivo ainda pode acarretar mudanças na morfologia do microrganismo. Com isso, a adequação e o controle do valor do pH em cultivos de *Monascus* spp. é importante no sentido de favorecer a obtenção de maior quantidade de pigmentos vermelhos.

Foi observado nos estudos de Moritz (2005), em ensaios realizados com *Monascus ruber* utilizando extrato de farelo de arroz parboilizado em biorreator, que a produção de pigmentos vermelhos ocorreu em valores de pH alcalinos. Ficou evidenciada a importância do pH no meio de cultivo para a ocorrência de maior produção de pigmentos vermelhos e para o aumento do crescimento celular.

A produção de pigmentos depende também da concentração de substrato. Em concentrações de glicose inferiores a 20 g.L<sup>-1</sup>, o crescimento e a produção de pigmento vermelho são excelentes; concentrações de glicose superiores a 20 g.L<sup>-1</sup> levam a um comportamento tipo *Crabtree*, com produção significativa de etanol, mas com crescimento celular e produção de pigmento reduzidos, mesmo em presença de oxigênio. Isso indica que pode haver efeito repressor da glicose (CHEN e JOHNS, 1994).

Há algumas contradições no que se refere ao efeito de fontes de carbono; alguns autores não encontraram efeito repressor para nenhuma fonte de carbono, trabalhando com concentrações de até 10% de carboidratos (Lin e Demain 1991 apud CARVALHO *et al.*, 2006).

Por isso, são necessários estudos variando a fonte de nitrogênio e o pH dos meios para a maior produção de pigmentos. E é importante também realizar cultivos com diferentes concentrações de substrato para verificar a existência de efeito repressor e otimizar o crescimento e a produção dos pigmentos.

## 5.2. METODOLOGIA

O objetivo desse capítulo foi estudar a influência da fonte de nitrogênio, do pH e da concentração de glicerol (P.A) em cultivos submersos, utilizando apenas o glicerol como substrato, para a máxima produção de pigmentos por *Monascus ruber*.

Os meios de cultivo empregados estão de acordo com Pastrana *et al.* (1995), onde a glicose foi substituída pelo glicerol. Foram compostos de glicerol, fonte de nitrogênio e sais.

Para o estudo da influência da fonte de nitrogênio foram realizados quatro cultivos contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e as seguintes fontes de nitrogênio: glicina C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> (5 g.L<sup>-1</sup>), glutamato monossódico C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (5 g.L<sup>-1</sup>), uréia CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (5 g.L<sup>-1</sup>) e sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 g.L<sup>-1</sup>) e sais. O pH inicial do cultivo foi ajustado para 6,5.

No estudo do pH foram realizados cinco ensaios contendo glicerol (20 g.L<sup>-1</sup>) glutamato monossódico (5 g.L<sup>-1</sup>) e sais, com o pH inicial do meio ajustado para 2,5; 4,0; 5,5; 6,5 e 8,0.

Nos ensaios para estudar a influência da concentração de glicerol, foram realizados seis cultivos contendo glutamato monossódico (5 g.L<sup>-1</sup>), sais e glicerol nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 g.L<sup>-1</sup>. O pH inicial também foi ajustado para 6,5.

Os cultivos foram realizados em frascos de *Erlenmeyer* aletados de 1000 mL com 360 mL de meio de cultivo. Os cultivos foram inoculados com 40 mL de inóculo de *Monascus ruber* e incubados em *shaker* orbital na temperatura de 30°C a uma frequência de 120 min<sup>-1</sup>. O tempo de cultivo foi de 168 a 192 h e uma amostra de cada cultivo foi retirada a cada 24 h.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmentos vermelhos

Nesta etapa foi verificada a importância da fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmentos vermelhos pelo *Monascus ruber*. Os grupos amina são responsáveis pela formação de pigmentos solúveis e extracelulares. O estudo desse fator é importante para se obter a maior produção de pigmentos vermelhos a partir de glicerol.

As Figuras 5.1 a 5.4 ilustram a evolução dos cultivos em meio sintético contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol inicial, sais e complementando com glicina, glutamato monossódico, uréia ou sulfato de amônio.

Observou-se maior produção de pigmentos e maior crescimento nos cultivos com glicina e glutamato monossódico. No cultivo com glicina houve formação de 7,46 g.L<sup>-1</sup> de biomassa e máxima produção de pigmentos vermelhos de 6,9 UDO<sub>480</sub> em 96 horas de cultivo. No cultivo com glutamato monossódico, a formação de biomassa foi de 6,98 g.L<sup>-1</sup> e a máxima produção de pigmentos vermelhos foi de 6,42 UDO<sub>480</sub> em 72 horas de cultivo.

No cultivo com glicina a cor se apresentou estável por mais tempo do que com glutamato monossódico. Com o glutamato a maior produção de pigmentos foi atingida mais rapidamente, porém a cor permaneceu estável por aproximadamente 48 horas, enquanto com glicina foi de aproximadamente 72 horas.

No cultivo com uréia houve menor produção de pigmentos e biomassa, e no cultivo com sulfato de amônio, a produção de pigmentos foi 70% menor.

Pastrana *et al.*, (1995) encontraram para frascos aletados de 250 ml com 26 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 5 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico, máxima produção de pigmentos em torno de 6 UA<sub>480</sub>, mesmo valor encontrado para o glicerol.

A concentração de biomassa nos ensaios contendo glicerol e glicina e glutamato monossódico foram bem superiores aos ensaios contendo uréia e sulfato de amônio, confirmando assim, os relatos bibliográficos que afirmam que a formação de pigmentos vermelhos está associada ao crescimento microbiano (HAJJAJ *et al.*, 1998).

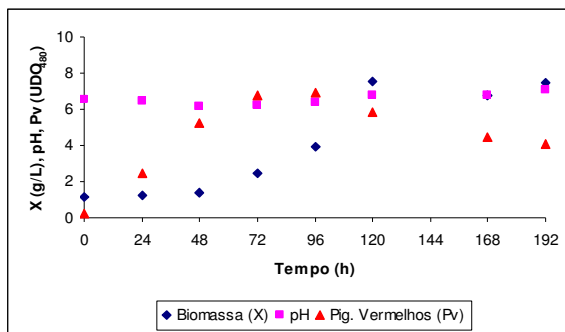


FIGURA 5.1 – Evolução do cultivo contendo glicina como fonte de nitrogênio.

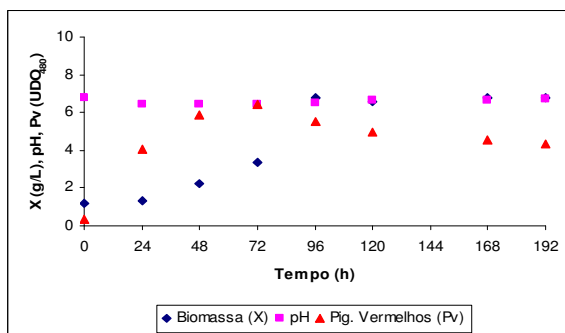


FIGURA 5.2 - Evolução do cultivo contendo GMS como fonte de nitrogênio.

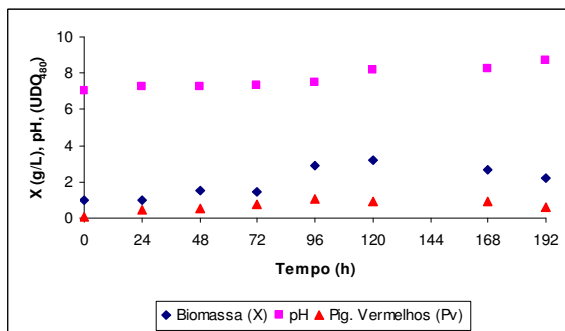


FIGURA 5.3 - Evolução do cultivo contendo uréia como fonte de nitrogênio.

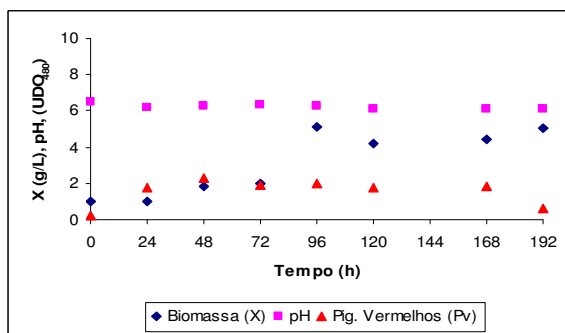


FIGURA 5.4 - Evolução do cultivo contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Também Babitha, Socool e Pandey (2006) verificaram em cultivos com *Monascus purpureus* que a fonte de nitrogênio é um fator muito importante no crescimento e na produção de pigmentos. Melhores resultados para crescimento e produção de pigmentos foram obtidos com glutamato monossódico. Fontes de nitrogênio orgânicas também foram ótimas para o crescimento, mas não para a produção de pigmentos. Já meios de cultivo na ausência de fonte de nitrogênio, não apresentaram formação de pigmentos solúveis em água.

A Tabela 5.1 apresenta os parâmetros cinéticos: velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), produtividade em células ( $P_{\text{células}}$ ), máxima produção de pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480}$ ) e produtividade máxima de pigmentos vermelhos, laranja e amarelos para os quatro cultivos. Os cálculos de  $\mu_{\text{máx}}$  estão apresentados no Apêndice C.

TABELA 5.1 – Parâmetros cinéticos para os quatro cultivos.

	A (Glicina)	B (GMS)	C (Uréia)	D (Sulfato de Amônio)
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,023	0,022	0,013	0,021
$P_{\text{células}}$ ( $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0,053	0,058	0,018	0,044
Pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480}$ )	6,9	6,42	1,04	2,01
$P_{\text{M}}$ Pig. Vermelhos ( $\text{UDO}_{480} \cdot \text{g}^{-1}$ )	0,07	0,08	0,01	0,04
$P_{\text{M}}$ Pig. Laranja ( $\text{UDO}_{420} \cdot \text{g}^{-1}$ )	0,08	0,10	0,01	0,04
$P_{\text{M}}$ Pig. Amarelos ( $\text{UDO}_{380} \cdot \text{g}^{-1}$ )	0,05	0,14	0,01	0,01

A produtividade em células e a de pigmentos vermelhos foi maior no cultivo com glutamato monossódico ( $0,058 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$  e  $0,08 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ), seguido do cultivo com glicina ( $0,053 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$  e  $0,07 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ). A máxima produção de pigmentos vermelhos, porém, foi maior em cultivo com glicina ( $6,9 \text{ UDO}_{480}$ ) seguido do cultivo em glutamato monossódico ( $6,42 \text{ UDO}_{480}$ ). Já a produção em cultivos com uréia e sulfato se apresentou menor: 1,04 e  $2,01 \text{ UDO}_{480}$ , respectivamente.

Blanc *et al.* (1998) também observaram que a maior produção de pigmentos vermelhos ocorre com os aminoácidos, glicina, histidina e glutamato. Porém, a maior produtividade observada foi com o glutamato ( $0,099 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ), seguida da glicina ( $0,091 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

A Figura 5.5 apresenta os frascos em 96 horas de cultivo. Observou-se que a formação de pigmentos vermelhos foi maior nos cultivos com glicina e glutamato monossódico, e menor no cultivo com uréia.



FIGURA 5.5 – Cultivos em diferentes fontes de nitrogênio. Da esquerda para a direita, glicina, glutamato monossódico, uréia e sulfato de amônio.

Para Lin e Demain (1991) apud OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN (2003), o uso de glutamato monossódico como fonte de nitrogênio estimula fortemente a produção de pigmentos vermelhos. Ocorre crescimento utilizando fontes de nitrogênio inorgânico (nitrato, amônio e seus sais), porém com menor produção de pigmentos.

A Figura 5.6 apresenta a produtividade de pigmentos vermelhos em função das quatro fontes de nitrogênio estudadas na fase de produção dos pigmentos.

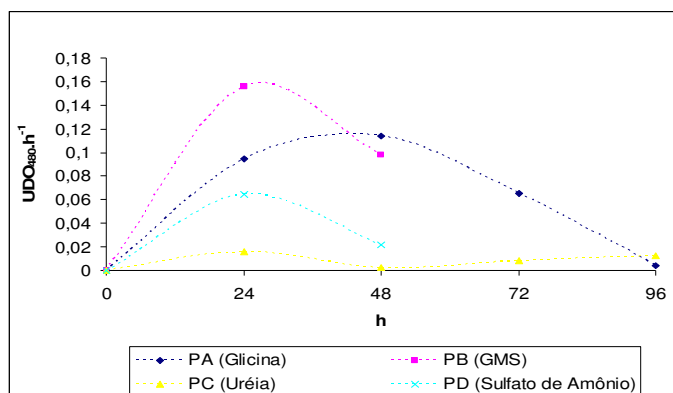


FIGURA 5.6 - Produtividade expressa em  $UDO_{480}.h^{-1}$  para as fontes de nitrogênio estudadas durante a fase de produção de pigmentos.

A produtividade foi calculada durante a fase de produção de pigmentos. Após a produção máxima ter sido atingida, ocorre declínio da quantidade de pigmentos solúveis no meio de cultivo, indicando o término da fase de produção.

Os valores de produtividade obtidos durante a fase de produção para os cultivos contendo glicina, glutamato monossódico, uréia e sulfato de amônio foram respectivamente de  $0,11 UDO_{480}.h^{-1}$ ;  $0,16 UDO_{480}.h^{-1}$ ;  $0,02 UDO_{480}.h^{-1}$  e  $0,06 UDO_{480}.h^{-1}$ .

Os maiores valores foram encontrados nos cultivos com glicina e glutamato monossódico. No glutamato a produtividade máxima foi atingida mais rapidamente, porém na glicina a produtividade foi mais estável durante quase toda a fase de produção, o que também pode ser observado pela área sob as curvas, que é maior no cultivo com glicina.

Moritz (2005) também estudou a utilização de glutamato monossódico, glicina, histidina e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  em meio sintético contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e também verificou maiores produtividades de pigmentos vermelhos em glicina e glutamato monossódico. O que também foi encontrado para o glicerol.

### 5.3.2 Influência do pH na produção de pigmentos

Nesta etapa foi estudada a influência do pH no crescimento e na produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando glicerol como substrato. A Figura 5.7 apresenta a cinética de crescimento nos cinco cultivos.

Houve maior crescimento no cultivo em pH 6,5 com  $6,01 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa. Em pH 2,5 e 4,0 o crescimento foi reduzido. Em pH 8,0 o crescimento foi de  $2,7 \text{ g.L}^{-1}$  e em pH 5,5 foi de  $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ . Observou-se crescimento em todos os valores de pH, porém foi maior em pH 5,5 a 8,0. De acordo com Yongsmith *et al*, 1993 apud OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003, em diferentes trabalhos observa-se crescimento em uma ampla faixa de pH, desde 2,5 até 8,0, sendo a faixa ideal de 4,0 a 7,0.

As Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 apresentam as cinéticas de produção de pigmentos nas cores amarelo, laranja e vermelho.

Em todos os cultivos o pH ajustado permaneceu praticamente constante durante todo o cultivo, não sendo variável em função do tempo.

A maior produção de pigmentos vermelhos foi observada no cultivo em pH 6,5, com máxima produção de  $3,64 \text{ UDO}_{480}$ , o equivalente a  $54,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de pigmentos vermelhos. Em pH 5,5 a produção foi de  $3,21 \text{ UDO}_{480}$ . Em pH 2,5 e 4,0 houve pouca produção de pigmentos vermelhos. Também a produção de pigmentos amarelos e laranjas foi maior no cultivo em pH 6,5, seguido do cultivo em pH 5,5.



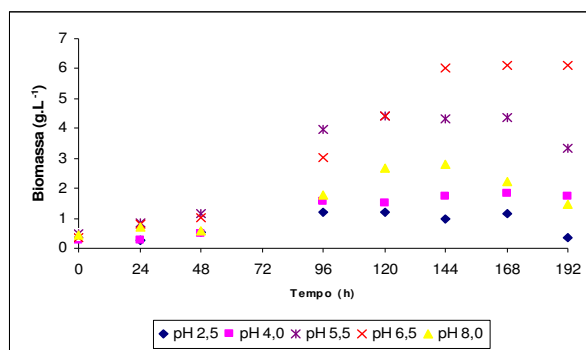


FIGURA 5.7 - Cinética de formação de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) em diferentes valores de pH.

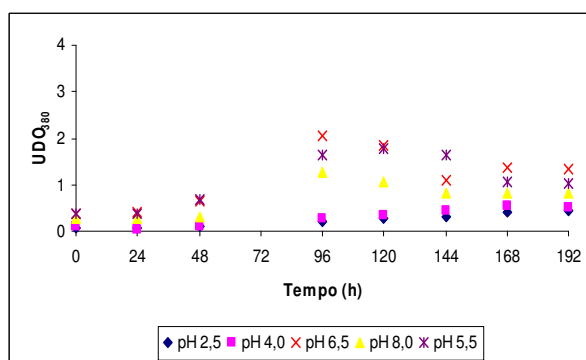


FIGURA 5.8 - Produção de pigmentos amarelos em diferentes valores de pH.

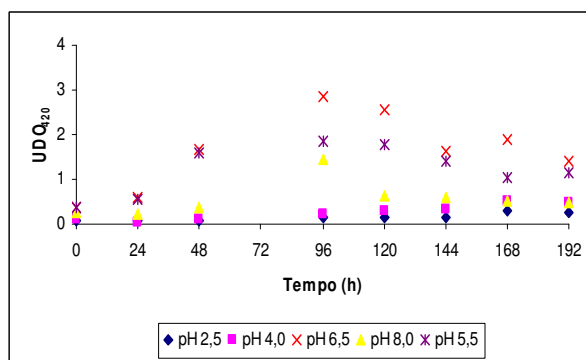


FIGURA 5.9 - Produção de pigmentos laranja em diferentes valores de pH.

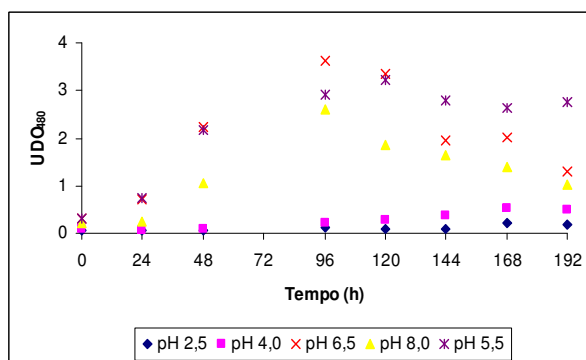


FIGURA 5.10 - Produção de pigmentos vermelhos em diferentes valores de pH.

Em cultivos submersos em pH ácidos os pigmentos permanecem intracelulares nos micélios devido à baixa solubilidade desses pigmentos em meios ácidos. Valores maiores de pH facilitam a remoção dos pigmentos do micélio e estão associados à conversão química dos pigmentos laranja em vermelhos (HAMDI *et al.*, 1997).

Para Babitha, Soccol e Pandey (2006), em pH 2,0 e 2,5, em cultivos com glicose, não houve crescimento. Em pH 4,0 o crescimento foi máximo e houve um aumento da produção de pigmentos nos valores de pH de 4,5 a 7,5. As figuras seguintes apresentam a coloração dos cultivos nos diferentes valores de pH em 120 horas de cultivo.



FIGURA 5.11 - Cultivos nos valores de pH 2,5; 4,0; 5,5; 6,5 e 8,0 em 120 h de cultivo.

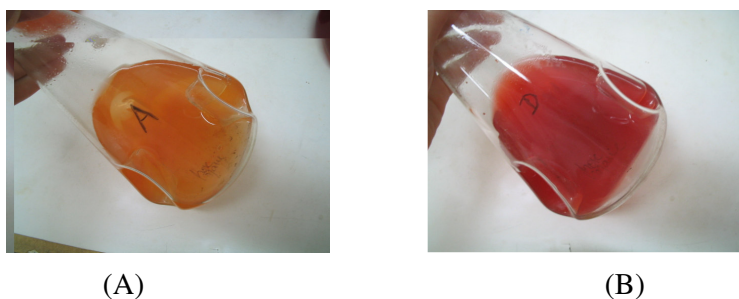


FIGURA 5.12 – (A) Cultivo em pH 2,5 e (B) Cultivo em pH 6,5.

Em pH ácido ocorreu inibição da produção de pigmentos vermelhos. Uma das hipóteses é que a liberação dos pigmentos intracelulares só ocorre em valores de pH alcalino, que favorece o aumento da permeabilidade celular ou da lise celular (PASTRANA *et al.*, 1995).

De acordo com Orozco, Pereira e Kilikian (2003) em pH 2,5, utilizando glicose, há produção principalmente de pigmentos amarelos e em pH 4 há favorecimento da produção de pigmentos amarelos e laranja, o que também foi observado utilizando o glicerol.

A Tabela 5.2 apresenta os parâmetros cinéticos para os cinco cultivos.

TABELA 5.2 – Parâmetros cinéticos para os cinco cultivos.

Parâmetro	A (pH 2,5)	B (pH 4,0)	C (pH 5,5)	D (pH 6,5)	E (pH 8,0)
$P_{\text{células}}$ ( $\text{g.h}^{-1}$ )	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02
$P_{\text{M. Pig. Vermelhos}}$ ( $\text{UDO}_{480}.\text{h}^{-1}$ )	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
$P_{\text{M. Pig. Laranja}}$ ( $\text{UDO}_{420}.\text{h}^{-1}$ )	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
$P_{\text{M. Pig. Amarelos}}$ ( $\text{UDO}_{380}.\text{h}^{-1}$ )	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01

A produtividade em células foi maior no cultivo em pH 6,5. A maior produtividade média de pigmentos vermelhos foi de 0,03 ( $\text{UDO}_{480}.\text{h}^{-1}$ ), também no cultivo em pH 6,5. As produtividades máximas de produção de pigmentos em pH 2,5 e 4,0 foram as menores.

A Figura 5.13 compara a máxima produção de pigmentos vermelhos e de biomassa em todos os cultivos.

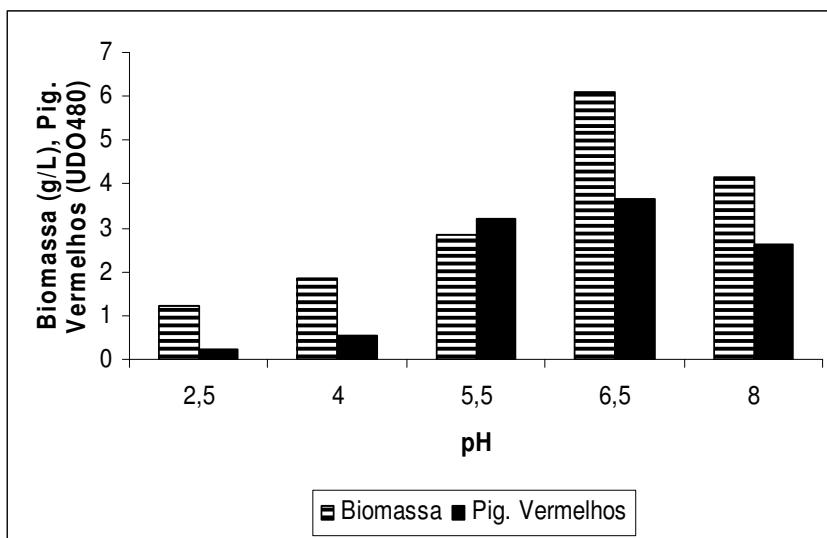


FIGURA 5.13 - Formação de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e de pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480}$ ).

A produção total de pigmentos aumenta com o aumento de pH, até o pH 6,5, estando associado ao crescimento.

A máxima produção de pigmentos vermelhos nos cultivos em pH 2,5 e 4,0 ficou abaixo de 1 UDO<sub>480</sub>. Também o crescimento nesses valores de pH não foi favorecido. De acordo com Orozco, Pereira e Kilikian (2003), a máxima produção de pigmentos vermelhos por *Monascus purpureus* CCT 3802 em cultivo com pH menor que 5,5, se apresentou em torno de 2,0 UDO<sub>480</sub>, o mesmo observado para o glicerol.

### **5.3.3 Cinéticas de crescimento e produção de pigmentos vermelhos em diferentes concentrações de glicerol**

Nesta etapa foi verificada a produção de pigmentos vermelhos em cultivos com diferentes concentrações de glicerol para verificar a maior produção de pigmentos vermelhos e a existência de efeito repressor.

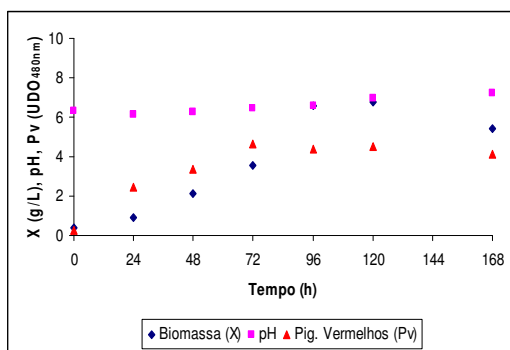
Foram realizados cultivos com concentração de glicerol em g.L<sup>-1</sup> de 10, 20, 30, 40, 50 e 60. O pH foi controlado e ajustado para 6,5 no início do cultivo. As Figuras 5.14, 5.15 e 5.16 apresentam a formação de biomassa, o pH e a produção de pigmentos vermelhos nos seis cultivos.

Observou-se maior produção de pigmentos e de biomassa nos cultivos contendo de 20 a 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Houve maior formação de biomassa no cultivo com 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (9,46 g.L<sup>-1</sup>). Para os outros cultivos a biomassa permaneceu entre 6 e 8 g.L<sup>-1</sup>.

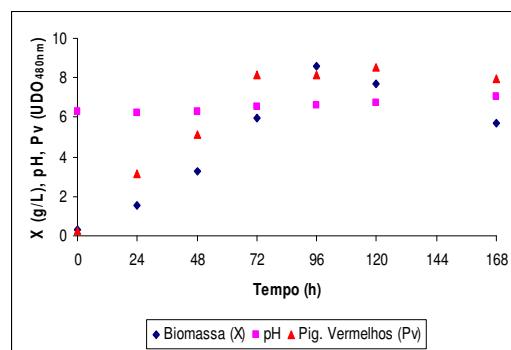
A fase de crescimento terminou em aproximadamente 96 horas de cultivo, com um leve aumento do pH até a diminuição da produção de pigmentos até o final do processo.

A produção de pigmentos vermelhos foi maior nos cultivos de 20 a 60 g.L<sup>-1</sup> e menor no cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. A máxima produção de pigmentos foi observada entre 72 e 96 horas de cultivo.

A máxima produção de pigmentos foi observada no cultivo com 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (9,28 UDO<sub>480</sub>). Já a menor produção foi observada no cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (4,62 UDO<sub>480</sub>). Nos cultivos entre 20 a 50 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, a produção de pigmentos variou de 7,57 a 9,04 UDO<sub>480</sub>.

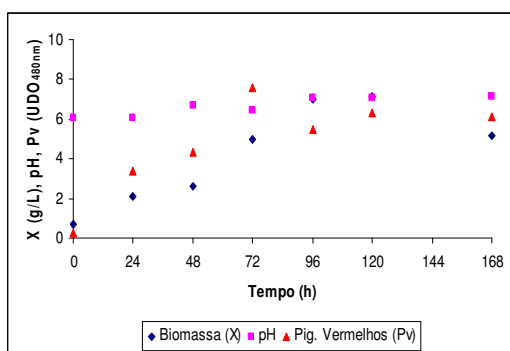


(A)

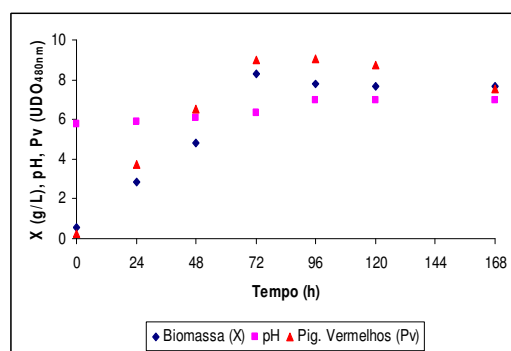


(B)

FIGURA 5.14 – (A) Cinética em cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e (B) Cinética em cultivo com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

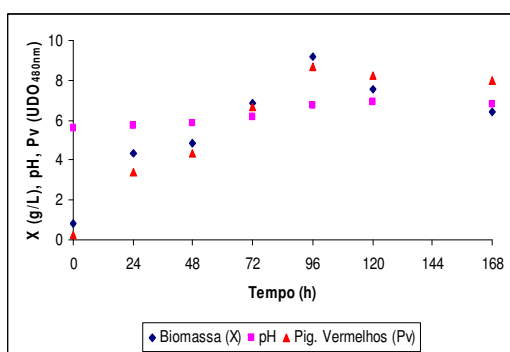


(A)

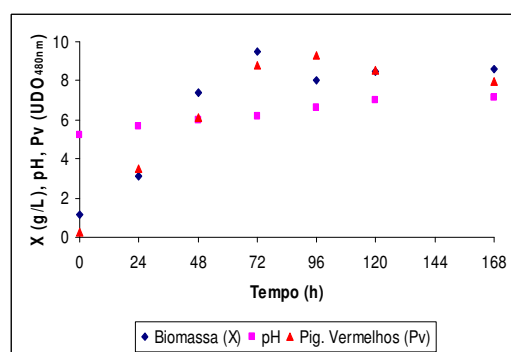


(B)

FIGURA 5.15 – (A) Cinética em cultivo com 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e (B) Cinética em cultivo com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.



(A)



(B)

FIGURA 5.16 – (A) Cinética em cultivo com 50 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e (B) Cinética em cultivo com 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

A Figura 5.17 apresenta os frascos com glicerol, em 120 horas de cultivo. Visualizando os cultivos é possível observar que houve grande formação de pigmentos vermelhos e de biomassa, não apresentando diferença perceptível na coloração.

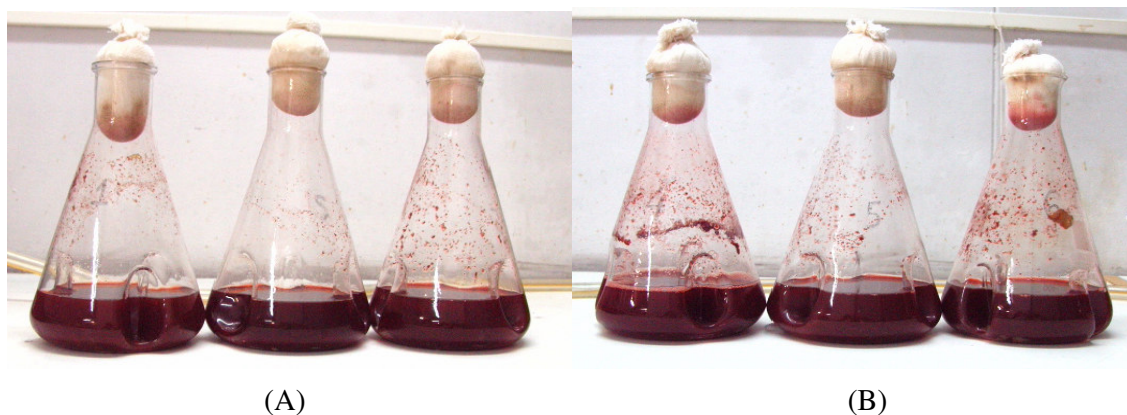


FIGURA 5.17 – (A) Frascos com cultivos contendo, 10, 20 e 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e (B) Frascos com cultivos contendo, 40, 50 e 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

Com o mesmo inóculo também foi realizado um cultivo em 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, que apresentou a seguinte cinética:

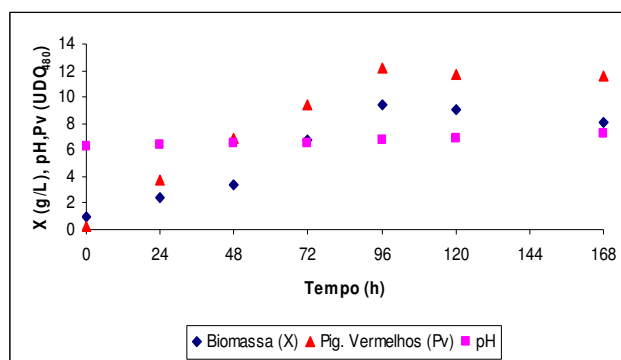


FIGURA 5.18 – Cinética no cultivo com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose.

A máxima formação de biomassa foi de 9,45 g.L<sup>-1</sup> e de pigmentos foi de 12,2 UDO<sub>480</sub>, em 96 horas de cultivo. O pH permaneceu em torno de 6,5 e aumentou para 7,0 em 168 h, indicando o final do cultivo.

A produção de pigmentos em glicerol foi aproximadamente 75% da observada em glicose. Porém, a biomassa produzida (9,45 g.L<sup>-1</sup>) foi idêntica a encontrada em cultivo com 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (9,46 g.L<sup>-1</sup>).

A Tabela 5.3 apresenta alguns parâmetros cinéticos para os cultivos. Os gráficos para o cálculo de  $\mu_{\text{máx}}$  estão apresentados no Apêndice D.

TABELA 5.3 - Parâmetros cinéticos para os cultivos.

Concentração de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	P <sub>células</sub> (g.h <sup>-1</sup> )	Máxima produção de pig. vermelhos (UDO <sub>480</sub> )	P <sub>M</sub> . Pig. Vermelhos (UDO <sub>480</sub> .h <sup>-1</sup> )
10	0,024	0,05	4,62	0,06
20	0,024	0,09	8,14	0,08
30	0,018	0,08	7,57	0,09
40	0,024	0,11	9,04	0,09
50	0,019	0,09	8,65	0,09
60	0,023	0,12	9,28	0,09
Glicose (20g.L <sup>-1</sup> )	0,020	0,09	12,21	0,12

As maiores produtividades máximas foram observadas nos cultivos de 30 a 60 g.L<sup>-1</sup>, de 0,09 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>. Foi possível verificar que a menor produtividade de pigmentos também ocorreu no cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (0,06 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>). No cultivo com glicose houve maior produção de pigmentos, com produtividade de 0,12 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>, o que já era esperado.

Em comparação aos ensaios realizados anteriormente, pôde-se observar maior crescimento e maior produção de pigmentos. Isso pode estar relacionado à morfologia do *Monascus ruber* durante esse experimento. Houve maior crescimento e formação de *pellets* menores, o que facilitou a produção extracelular de pigmentos vermelhos.

A morfologia do fungo durante o cultivo influencia muito a formação de pigmentos. Uma diminuição dos tamanhos dos *pellets* aumenta a produção de pigmentos e uma maior aeração também proporciona maior produção de pigmentos (PASTRANA *et al.*, 1995).

O controle da morfologia é importante para se obter melhores resultados. O controle morfológico durante os cultivos de *Monascus* tem um efeito no rendimento final de produção de pigmentos (KIM *et al.*, 2002).

Também foi verificado em outros estudos (PASTRANA *et al.*, 1995 e SILVEIRA, DAROIT e BRANDELLI, 2008) que um aumento na concentração da fonte de nitrogênio aumenta significativamente a produção de pigmentos vermelhos. Nesse estudo houve variação da concentração de glutamato monossódico de 4 a 15 g.L<sup>-1</sup>, para que a razão C/N permanecesse a mesma em todos os cultivos. Isso sugere que maiores estudos são necessários para a avaliação da influência da concentração de glicerol e de glutamato monossódico na produção de pigmentos vermelhos.

## 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fatores estudados influenciaram muito no crescimento e na produção de pigmentos.

O glutamato monossódico e a glicina favoreceram a produção de pigmentos vermelhos em cultivos contendo glicerol como único substrato, com máxima produção de 6,42 e 6,9 UDO<sub>480</sub>, respectivamente. A maior produtividade foi encontrada com o glutamato monossódico (0,08 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>) em 72 horas de cultivo. Em glicina a produtividade foi de 0,07 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup> em 96 horas de cultivo, porém a cor permaneceu estável em um intervalo de tempo maior. Em uréia e sulfato de amônio, a produção e o crescimento não foram favorecidos.

Já para o pH, o cultivo em pH 6,5 apresentou maior formação de biomassa e maior produção de pigmentos comparados aos outros cultivos, favorecendo a produção de pigmentos vermelhos em glicerol. Também em cultivo com glicerol, em valores de pH ácido, ocorreu inibição da produção de pigmentos vermelhos e maior produção de pigmentos amarelos e laranjas, mesmo comportamento observado nos cultivos com glicose. O controle do pH é importante em cultivos submersos, pois possibilita uma maior produção de pigmentos vermelhos e um maior crescimento.

No estudo da influência da concentração de glicerol foi verificada maior produção de pigmentos (9,28 UDO<sub>480</sub>) no cultivo com 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. A produtividade permaneceu em 0,09 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup> nos cultivos de 30 a 60 g.L<sup>-1</sup>.

O oxigênio dissolvido nos frascos foi o mesmo em todos os cultivos. Como se observou que para os cultivos com concentração de 30 a 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, a produtividade e a produção máxima de pigmentos vermelhos encontradas foram praticamente as mesmas, pode se concluir que o oxigênio é um fator limitante para o crescimento e a produção dos pigmentos. Com o aumento da concentração de glicerol não se verificou maior produção de pigmentos então, o glicerol, provavelmente, não foi totalmente consumido devido à limitação do oxigênio. Também não foi observado efeito repressor em maiores concentrações de glicerol.

Outro fator muito importante observado foi a morfologia do fungo. Diferentes morfologias e tamanho do *pellets* influenciaram na produção dos pigmentos. Houve maior produção de pigmentos em cultivos com formação de *pellets* menores e hifas.



## 6 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Nessa etapa foi utilizado delineamento fatorial de metodologia de superfície de resposta para avaliar os efeitos e otimizar a produção de pigmentos vermelhos em cultivos a partir de glicerol. As variáveis estudadas foram: concentração de glicerol e concentração da fonte de nitrogênio.

### 6.1 INTRODUÇÃO

Para determinar as condições ótimas, avaliar os efeitos que variáveis independentes ou fatores e as interações têm sobre as respostas é interessante planejar um procedimento experimental. A redução do número de ensaios, do custo e qualidade das informações utilizando planejamento experimental são incontestáveis, quando comparado com a metodologia convencional que avalia um fator por vez (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Os primeiros trabalhos sobre processos microbianos foram realizados usando a técnica de um fator por vez. Esse método convencional muitas vezes falha em localizar as condições ótimas porque não apresenta os efeitos e interações entre as variáveis. Planejamento fatorial e técnicas de superfície de resposta são importantes ferramentas para a determinação das condições ótimas de processos. Essa metodologia têm sido usada com sucesso em muitas áreas da biotecnologia, particularmente para otimizar a produção de moléculas bioativas (CLADERA-OLIVEIRA, CARON e BRANDELLI, 2004 e SILVEIRA, DAROIT e BRANDELLI, 2008).

Vários fatores como pH inicial do meio, temperatura, substrato, fontes de nitrogênio e concentração de sais podem influenciar a produção de pigmentos por *Monascus*. Contudo, os fatores que são apontados como parâmetros que influenciam fortemente o crescimento e a produção de metabólitos secundários são a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio (PASTRANA *et al.*, 1995), agitação e aeração (HAJJAJ *et al.*, 2000a) e concentração de oxigênio (HAMDI, BLANC e GOMA, 1996).

Silveira, Daroit e Brandelli (2008) estudaram a produção de pigmentos por *Monascus purpureus* em cultivo submerso utilizando bagaço de uva de indústrias de vinhos como

substrato. Os fatores concentração de substrato, peptona e glutamato monossódico foram avaliados usando planejamento experimental e método de superfície de resposta para estabelecer as condições ótimas para produção de pigmentos.

Pastrana *et al.* (1995) também otimizaram a composição de um meio de cultivo para a produção de pigmentos por *Monascus ruber* em cultivo submerso. Os fatores avaliados foram: concentração de glicose, concentração de glutamato monossódico e concentração de fosfatos.

Ainda, Chan *et al.* (2002), usaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar o meio de cultivo para a produção de lovastatina por *Monascus ruber*. Os fatores estudados foram: concentração de fonte de carbono e concentração de fonte de nitrogênio.

## 6.2 METODOLOGIA

Foi realizado um planejamento experimental  $3^2$  variando as concentrações de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio. Utilizou-se o glicerol (P.A.) como fonte de carbono e o glutamato monossódico como fonte de nitrogênio. Os cultivos foram realizados em frascos agitados. Foram realizados dois ensaios. Cada ensaio foi composto de nove meios de cultivo, mais uma repetição do ponto central, totalizando 10 frascos.

Os meios de cultivo empregados estão de acordo com Pastrana *et al.* (1995) em que a glicose foi substituída pelo glicerol adicionada de glutamato monossódio e de sais.

Os ensaios foram realizados em frascos aletados de 1000 mL com 360 mL de meio de cultivo adicionado de 40 mL de inóculo de *Monascus ruber*. Os frascos foram incubados a 30°C em *shaker* com agitação de 120 min<sup>-1</sup>. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,5 e uma amostra foi retirada a cada 24 horas.

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 6.1 apresenta os valores experimentais e as respostas, Máxima produção de pigmentos vermelhos em  $UDO_{480}$ , Produtividade de pigmentos vermelhos ( $UDO_{480}.h^{-1}$ ) e Formação de biomassa ( $g.L^{-1}$ ).

TABELA 6.1 – Valores reais, codificados e respostas.

Cultivo	Glicerol	GMS	Glicerol ( $g.L^{-1}$ )	GMS ( $g.L^{-1}$ )	Pigmentos Vermelhos ( $UDO_{480}$ )	P <sub>M</sub> . Pig. Vermelhos ( $UDO_{480}.h^{-1}$ )	Biomassa ( $g.L^{-1}$ )
1	-1	-1	10	1	1,7	0,008	4,12
2	-1	0	10	5	6,07	0,043	6,16
3	-1	+1	10	9	6,64	0,048	6,31
4	0	-1	40	1	1,62	0,009	4,74
5	0	0	40	5	7,06	0,054	7,38
6	0	+1	40	9	7,38	0,058	8,44
7	+1	-1	70	1	1,87	0,014	4,89
8	+1	0	70	5	7,02	0,055	7,73
9	+1	+1	70	9	7,36	0,054	8,41
10	0	0	40	5	6,77	0,053	7,20

GMS = Glutamato monossódico.

Através de análise estatística dos resultados obtidos para as respostas Máxima produção de pigmentos e Produtividade de pigmentos vermelhos foi observado que os termos linear e quadrático da variável concentração de glutamato monossódico (fonte de nitrogênio) são significativos. A variável concentração de glicerol também apresentou efeito significativo na faixa estudada para o termo linear, porém o efeito foi menor. A interação entre as variáveis e o termo quadrático da concentração de glicerol não apresentaram efeito significativo. A análise estatística para a resposta Máxima produção de pigmentos vermelhos está apresentada na Tabela 6.2 e a análise dos efeitos da resposta Produtividade máxima de pigmentos vermelhos ( $UDO_{480}.h^{-1}$ ) está apresentada no Apêndice E (Tabela E.1).

TABELA 6.2 - Coeficientes para a Máxima produção de pigmentos vermelhos. L: termo linear; Q: termo quadrático.

Variável	Coeficiente de regressão	Erro padrão	teste-t	Valor de p
Média	-0,93	0,236	-3,94	0,000*
Glicerol (L)	0,033	0,011	2,90	0,011*
Glicerol (Q)	-0,001	0,000	-2,03	0,060
GMS (L)	2,091	0,082	25,56	0,000*
GMS (Q)	-0,142	0,008	-17,86	0,000*

\* Valores significativos  $p < 0,05$

O modelo que descreve a superfície de resposta para a Máxima produção de pigmentos, segue a equação seguinte (6.1), apenas com os termos significativos.

$$\text{UDO}_{480} = -0,93 + 0,033.\text{Glicerol} + 2,091.\text{GMS} - 0,1412.\text{GMS}^2 \quad (6.1)$$

$$R^2 = 99,02$$

A partir da análise de variância (Tabela 6.3) se verificou que o modelo ajustado é significativo ( $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ) com variação explicada igual a 99,02%.

TABELA 6.3 – Análise de variância para a resposta Máxima produção de pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480}$ ).

Fator	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{tab}}$
Regressão	112,6	4	28,15		
Resíduos	2,424	15	0,142	198,24	3,06
Total	115,36	19	6,072		

A Figura 6.1 apresenta a superfície de resposta e a Figura 6.2 apresenta as curvas de contorno para a Máxima produção de pigmentos vermelhos.

Através da superfície de resposta e das curvas de contorno foi possível determinar a região ótima para a máxima produção de pigmentos vermelhos, em torno de 7  $\text{UDO}_{480}$ , obtidas em 120 horas de cultivo.

A região ótima para a produção de pigmentos utilizando glicerol como fonte de carbono e glutamato monossódico como fonte de nitrogênio é: 40 a 70  $\text{g.L}^{-1}$  de glicerol e 7 a 8  $\text{g.L}^{-1}$  de glutamato monossódico.

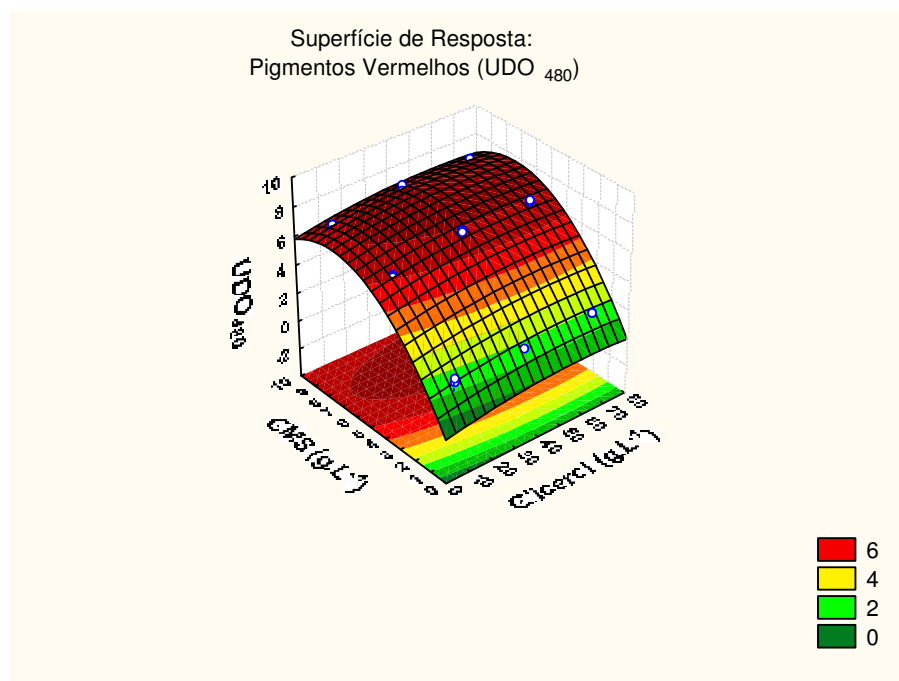


FIGURA 6.1 – Superfície de resposta obtida para a Máxima produção de pigmentos vermelhos (UDO<sub>480</sub>).

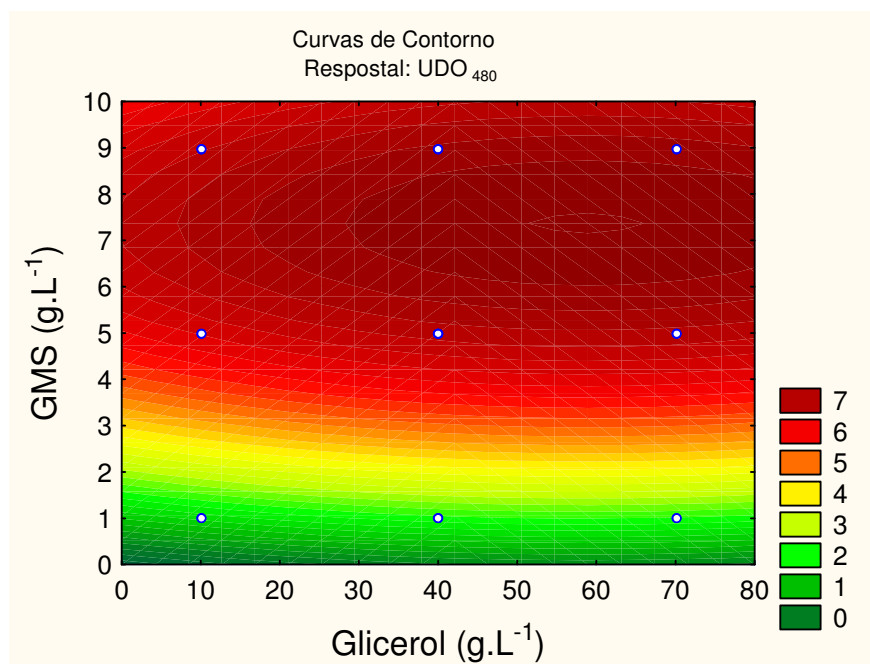


FIGURA 6.2 – Curvas de contorno obtidas para a Máxima produção de pigmentos vermelhos (UDO<sub>480</sub>).

Pastrana *et al.* (1995) em seus estudos, observaram que os valores de absorbância dos pigmentos vermelhos obtidos foram independentes da concentração de fonte de carbono (glicose) em cultivos com glicose. Em cultivos com baixas concentrações de fosfato (3 g.L<sup>-1</sup>)

o aumento da concentração de glutamato monossódico aumentou a produtividade de pigmentos vermelhos, o que não foi observado em maiores concentrações de fosfato. Sendo que a concentração de glutamato monossódico apresentou então, efeito significativo. A condição ótima obtida por Pastrana *et al.* (1995) para a produção e melhor qualidade dos pigmentos vermelhos foi de 26 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico, 5 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 5 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Para Silveira, Daroit e Brandelli (2008), no estudo da utilização do bagaço de uva, a produção de pigmentos é afetada significativamente pela concentração de nitrogênio. As fontes utilizadas foram peptona e glutamato monossódico, sendo que a peptona apresentou o maior efeito. A produção de pigmentos aumentou com o aumento da concentração de peptona. Contudo, a concentração de substrato não apresentou efeito significativo na produção de pigmentos. A condição ótima obtida foi de peptona 20 a 22,5 g.L<sup>-1</sup> e bagaço de uva de 5 a 30 g.L<sup>-1</sup> resultando em 5 UDO<sub>480</sub>. A adição de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de GMS resultou em 9 UDO<sub>480</sub>.

Então, a adição de glutamato monossódico no meio de cultivo resulta em um aumento da produtividade de pigmentos vermelhos, facilitando a formação de complexos pigmento-glutamato (PASTRANA *et al.* 1995 e SILVEIRA, DAROIT e BRANDELLI, 2008).

Dominguez-Espinosa e Webb (2003) também observaram que baixas concentrações de nitrogênio no meio de cultivo possuem um efeito prejudicial no crescimento e na produção de pigmentos.

O teste-t foi aplicado para verificar a diferença significativa entre as respostas para diferentes concentrações de glutamato monossódico nos cultivos contendo 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

TABELA 6.4 – Teste-t para cultivos com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e concentração de GMS variando de 1 a 9 g.L<sup>-1</sup>.

Concentração de glutamato monossódico (g.L <sup>-1</sup> )	UDO <sub>480</sub>
1	1,61 <sup>a</sup>
5	7,06 <sup>b</sup>
9	7,38 <sup>b</sup>

Obs.: Letras diferentes indicam diferença significativa a 95%.

Através do teste-t foi possível observar que em concentrações de glutamato monossódico variando de 5 a 9 g.L<sup>-1</sup> não existe diferença significativa entre as respostas. Porém, para concentrações de 1 a 5 g.L<sup>-1</sup> a diferença foi significativa. Ocorre maior produção

de pigmentos em concentrações acima de 5 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico, também observado por Pastrana *et al.* (1995).

Em concentrações muito baixas de fonte de nitrogênio não ocorre solubilização dos pigmentos no meio. Esse comportamento foi verificado em todos os cultivos contendo 1 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico.

A Figura 6.3 apresenta a superfície de resposta para a Produtividade de pigmentos vermelhos e a Figura 6.4 apresenta a superfície para a resposta Biomassa (g.L<sup>-1</sup>).

O modelo que descreve a superfície de resposta para a Produtividade de pigmentos vermelhos segue a Equação 6.2 e a Tabela 6.5 apresenta a análise de variância.

$$\text{Prod. Pig. Verm. (UDO}_{480}\text{.h}^{-1}) = -0,014 + 0,0004.\text{Glicerol} + 0,017.\text{GMS} - 0,001.\text{GMS}^2 \quad (6.2)$$

$$R^2 = 97,76$$

TABELA 6.5 – Análise de variância para a resposta produtividade de pigmentos vermelhos (UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>).

Fator	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	0,00756	4	0,00189		
Resíduos	0,00018	15	1,2*10 <sup>-5</sup>	157,5	3,06
Total	0,00787	19	4,1*10 <sup>-4</sup>		

A variação explicada é de 97,76% e o valor de F<sub>calc</sub> também indica que o modelo é adequado. A Equação 6.3 descreve a formação de biomassa e a Tabela 6.6 apresenta a análise de variância para essa resposta.

$$\text{Biomassa(g.L}^{-1}\text{)} = 2,11 + 0,072.\text{Glicerol} - 0,0006.\text{Glicerol}^2 + 0,92.\text{GMS} - 0,052.\text{GMS}^2 \quad (6.3)$$

$$R^2 = 93,1$$

TABELA 6.6 – Análise de variância para a resposta biomassa (g.L<sup>-1</sup>)

Fator	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	41,59	4	10,39		
Resíduos	3,14	15	0,21	49,47	3,06
Total	45,58	19	2,40		

O modelo ajustado é significativo com variação explicada igual a 93,1 %.

Através das superfícies de resposta obtidas pode-se observar que a maior biomassa e a maior produtividade de pigmentos vermelhos foram obtidas entre 40 a 70 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 7



a  $9 \text{ g.L}^{-1}$  de glutamato monossódico. Concordando então, com a superfície obtida para a máxima produção de pigmentos vermelhos.

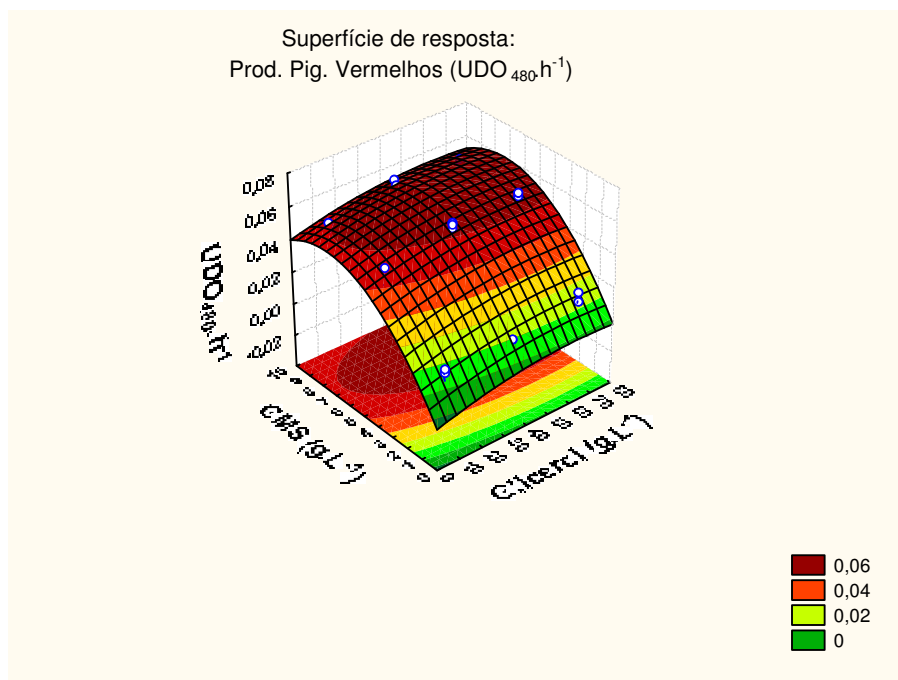


FIGURA 6.3 – Superfície de resposta para a Produtividade de pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ )

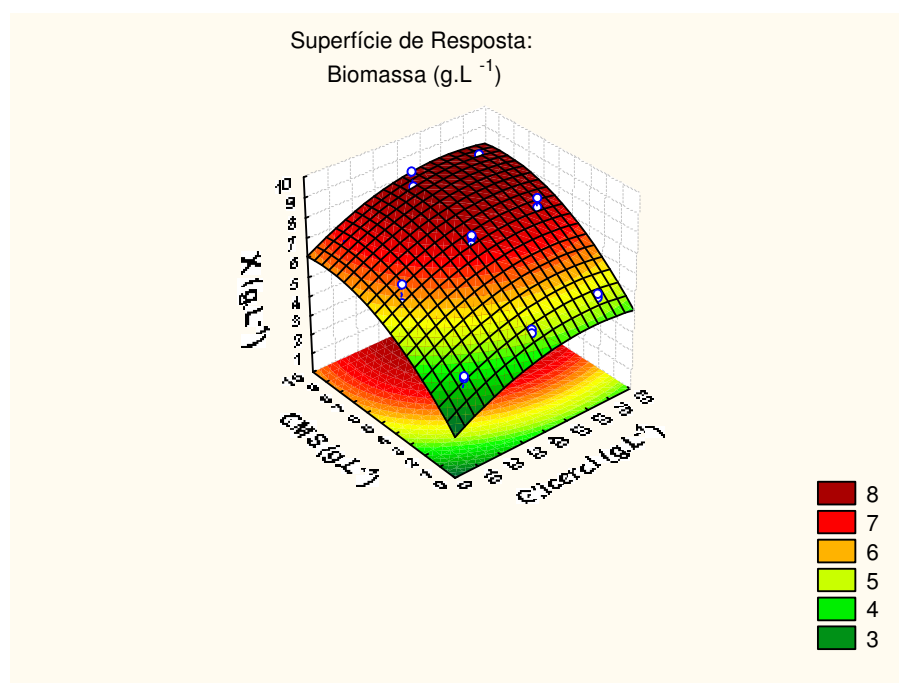


FIGURA 6.4 – Superfície de resposta para a Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

Também a produtividade máxima de pigmentos vermelhos aumentou com o aumento da concentração de glutamato monossódico. A produtividade obtida na região ótima foi de aproximadamente  $0,055 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ , entre 120 e 144 horas de cultivo.

Para a biomassa as variáveis significativas também foram concentração de glutamato monossódico e concentração de glicerol (termos linear e quadrático,) o que está apresentado na Tabela E.2, Apêndice E.

A avaliação da biomassa formada é muito importante, pois a produção de pigmentos vermelhos está associada ao crescimento. Em baixas concentrações de nitrogênio houve formação de aproximadamente  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa. Já na região ótima, houve formação de aproximadamente  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa.

Para todas as respostas, em concentrações de glicerol de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , houve menor produção de pigmentos vermelhos. Assim, as condições ótimas para a produção de pigmentos devem partir de cultivos com pelo menos  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol.

A Figura 6.5 apresenta os frascos em *shaker* em 120 horas de cultivo e a Figura 6.6 apresenta amostras filtradas de cada cultivo.



FIGURA 6.5 – Produção de pigmentos em frascos aletados em 120 horas de cultivo.

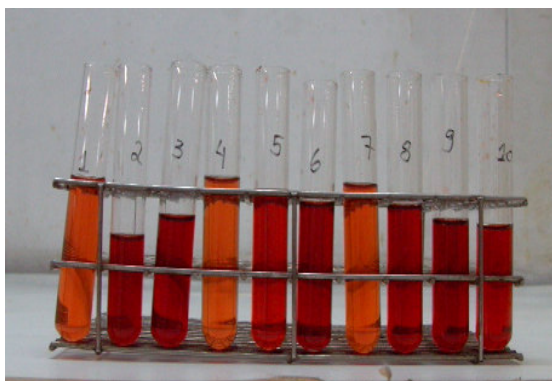


FIGURA 6.6 – Amostras dos cultivos.

Através da Figura 6.6, observa-se que é perceptível a diferença de tonalidade nas amostras 1, 4 e 7 que continham apenas 1 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico, em relação às outras. Nas outras amostras a coloração não apresentou diferenças visíveis. Visualmente, também foi possível verificar que a concentração da fonte de nitrogênio apresenta grande efeito na produção de pigmentos solúveis.

#### 6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração de fonte de nitrogênio apresentou grande efeito nas respostas. Com o aumento da concentração de glutamato monossódico houve um aumento da produção e liberação no meio dos pigmentos vermelhos.

A partir do planejamento experimental e da obtenção das superfícies de resposta foi possível identificar a região ótima para a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* utilizando glicerol como único substrato. A região ótima encontrada foi de 40 a 70 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 7 a 8 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico.

Novamente se observou influência da aeração, com limitação do oxigênio, uma vez que não se observou maior produção de pigmentos em maiores concentrações de glicerol, não sendo ele totalmente consumido.

Cultivos com concentrações de glutamato monossódico acima de 5 g.L<sup>-1</sup> e concentrações de glicerol acima de 20 g.L<sup>-1</sup>, favoreceram a produção de pigmentos vermelhos e o crescimento.

A maior produção de pigmentos foi de 7,38 UDO<sub>480</sub>, com produtividade de 0,058 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>, e formação de 8,44 g.L<sup>-1</sup> de biomassa.

## 7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO

Nesse estudo foi possível avaliar o crescimento e a produção de pigmentos por *Monascus ruber* a partir de glicerol como substrato. Os principais resultados estão listados abaixo:

1. Foi observado que o glicerol pode ser utilizado como substrato para a produção de pigmentos por *Monascus ruber*. Contudo, em comparação com cultivos utilizando glicose, a produtividade foi aproximadamente 30% menor.
2. As melhores fontes de nitrogênio para a produção de pigmentos a partir de glicerol foram a glicina e o glutamato monossódico.
3. O pH ótimo para a produção de pigmentos vermelhos é de 6,5. Em pH ácidos houve inibição da produção de pigmentos vermelhos e maior produção de pigmentos amarelos e laranjas.
4. Não foi observado efeito repressor para a produção de pigmentos e de crescimento em maiores concentrações de glicerol.
5. O oxigênio é provavelmente um fator limitante para o crescimento e para a produção de pigmentos, sendo um parâmetro muito importante que também deve ser avaliado.
6. Na otimização, a concentração de glutamato monossódico apresenta grande efeito na produção de pigmentos vermelhos. Com o aumento da concentração de nitrogênio, aumenta a produção de pigmentos vermelhos. A região ótima para a produção de pigmentos encontrada foi: 40 a 70g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 7 a 8 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico.

## 7.2 CONCLUSÃO

Com o aumento da demanda de biodiesel e conseqüente aumento do resíduo glicerol, os resultados encontrados neste trabalho demonstram que é importante e possível a obtenção por via biotecnológica de moléculas de maior valor agregado, como os pigmentos vermelhos.

Assim, o glicerol apresenta potencial como substrato para a produção de pigmentos naturais por *Monascus ruber*.

## 7.3 PERSPECTIVAS PARA NOVOS ESTUDOS

1. Estudar e controlar os parâmetros de agitação e aeração nos cultivos de *Monascus ruber* em cultivo submerso.
2. Estudar a produção de citrinina e outras moléculas em cultivos a partir de glicerol.
3. Estudar a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* utilizando glicerol com substrato em biorreator.
4. Avaliar a estabilidade dos pigmentos produzidos a partir de glicerol.
5. Estudar a utilização de glicerol derivado de biodiesel como substrato para a produção de pigmentos *Monascus*.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Legislação/Alimentos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos>>, 2007.
- ARAUJO, M. L. C. G. **Método químico de determinação de glicerol**. DEQ/UFSCar, 2006.
- BABITHA. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Jackfruit Seed – a novel substrate for the production of monascus pigments through solid-state fermentation. **Food Technol. Biotechnol**, v. 44, n.4, p. 465–471, 2006.
- BARANOVÁ, M.; MALA, P.; BURDOVÁ, O.; HADBAVNY, M.; SABOLOVÁ, G. Effect of natural pigment of *Monascus purpureus* on the organoleptic characters of processed cheeses. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, n.48, p. 59-62, 2004.
- BLANC, P. J.; LAUSSAC J.; LE BARS, J.; LE BARS, P.; LORET, M. O.; PAREILLEUX, A.; PROMÉ, D.; PROMÉ, J. C.; SANTERRE, A. L.; GOMA, G. Characterization of Monascidin A from *Monascus* as citrinin. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.27, p. 201-213, 1995.
- BLANC, P. Les pigments rouges de *Monascus*. **Biofutur**, n.183, 1998.
- BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DEFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J.A. New heterogeneous for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, v. 106, p. 190-192, 2005.
- CARVALHO, J. C.; OISHI, B. O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Biopigments from *Monascus*: Strain Selection, Citrinin Production and Color Stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.6, p. 885-894, 2005.
- CARVALHO, J. C. PANDEY, A.; OISHI, B. O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 262-269, 2006.
- CHAN, Y.; HUANG, J.; LEE, C.; SHIH, I.; TZENG, Y. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p. 889-894, 2002.

CHEN, M. H. E JOHNS, M. R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus* **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 132-138, 1993.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537 - 1545, 2007.

CLADERA-OLIVEIRA. F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 53–58, 2004.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2002.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 94, p. 821-829, 2006.

DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, R. M. e WEBB, C. Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 329-336, 2003.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389-406, 2005.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 313-321, 2006.

EVANS, P. J. e WANG, H. Y. Pigment production from immobilized *Monascus* ssp. Utilizing polymeric resin adsorption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1323-1326, jun., 1984.

ERDOGRUL, O. e AZIRAK, S. Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 37-49, 2004.

FABRE C. E.; SANTERRE, A.L.; LORET, M.O.; BABERIAN, R.; PAREILLEUX, A.; GOMA G., BLANC P. J. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. **J. Food Sci.**, 58 (5), 1993: 1099-1110

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; KOTA, K.; BANDI, R. Glycerol based automotive fuels from future biorefineries. **Fuel**, v. 86, p. 2806 – 2809, 2007.

FINK-GREMMELS, J., J. DRESEL e L. LEISTNER. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. **Fleischwirtsch**, v.71:1184-1186, p.1184-1186. 1991.

FURTADO, M. **Corantes**: Indústria de corantes adere aos corantes naturais. Disponível em <<http://www.quimica.com.br/revista/qd398/corantes4.htm>> Acesso em 30 de março de 2007.

GABIATTI JUNIOR, C., PIAI, J. C., Z., RODRIGUES, R. C. E VENDRUSCOLO, F. **Produção de biossurfactantes utilizando o processo de fermentação em estado sólido**. Projeto de Conclusão do Curso de Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Rio Grande/RS. 2003.

GABIATTI JUNIOR, C.; VENDRUSCOLO, F.; PIAIA, J. C. Z.; RODRIGUES, R. C.; DURRANT, L. R.; COSTA, J. A. V. Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediation. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An Internacional Journal**, v. 47, n. 5, p. 225 – 232, dez, 2004.

GUIMARÃES, J. L.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Preparo de Compósitos biodegradáveis a partir de fibras de bananeiro plastificadas com amido e glicerina bruta derivada da alcóolise de óleos vegetais, 2005.

HAJJAJ, H.; KLAÉBÉ, A.; LORET, M. O.; TZÉDAKIS, T.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Production and Identification of N-Glucosylrubropunctamine and N-Glucosylmonascubramine from *Monascus ruber* and Occurrence of Electron Donor-Acceptor complexes in these red pigments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2671-2678, 1997

HAJJAJ, H.; P. J. BLANC, P. J.; GOMA, G. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. **Fems Microbiology Letters**, v.164, n.1, p. 195-200, 1998.

HAJJAJ, H.; KLAÉBÉ, A.; LORET, M. O.; GOMA, G.; BLANC, P. J.; FRANÇOIS, J. Biosynthetic Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 311-314, jan., 1999.



HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 619-625, 2000b.

HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; GOMA, G.; BLANC, P. J.; BARBIER, E.; FRANCOIS, J. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1120-1125, 2000a.

HAMANO, P. S.; OROZCO, S. F. B. M.; KILIKIAN, B. V. Concentration Determination of Extracellular and Intracellular Red Pigments Produced by *Monascus* ssp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 43-49, 2005.

HAMANO, P. S. e KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.

HAMDI, M.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Effect of Aeration Conditions on the production of Red Pigments by *Monascus purpureus* growth on prickly pear juice. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6; p. 543-547, 1996.

HAMDI, M.; BLANC, P. J.; LORET, M. O.; GOMA, G. A new process for red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus*. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 75-79, 1997.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1367 – 1372, 2007.

JUZLOVÁ P., MARTÍNKOVÁ L., KREN V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review **J. Ind. Microbiol.**, v. 16, 1996: 163-170

KIM H. J.; KIM J. H.; OH H. J.; SHIN C. S. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Proc. Biochem.**, v. 38, p. 649-655, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1984. 7ª edição.

LAMBERT, M. e NEISH, A.C. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. **Canadian Journal of Research**, v.28, n.3, p. 83-89, 1950.

LE DUY, A. e ZADIC, J. E. A geometrical approach for the differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n.4, p. 805-810, 1973.

LEE Y. K. e CHEN D. C. **Applications of *Monascus* pigments as food colorant**. 2002. Disponível em: <<http://www.allok.com/literature>>. Acesso em outubro 2006.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p. 292-295, 2007.

LIAN, X.; WANG, C.; GUO, K. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. **Dyes and Pigments**, 2005.

LIMA, P. C. R. **Biodiesel: um novo combustível para o Brasil**. 2005.

MANCZYK, C. **O mercado de corantes artificiais para alimentos**. Disponível em: <<http://www.sensient-tech.com>>. Acesso em novembro de 2007.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina máxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 8, p. 1075-1079, 1998.

MIYASHIRA, G.; RODRIGUES R.; KILIKIAN, B. V. Seleção de Linhagens de *Monascus* sp. para Cultivo em Meio Semi-sólido. **SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis - SC: Anais - artigo 133 CD-room, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORITZ, D. E. **Estudo da produção de pigmentos alimentares por *Monascus ruber* CCT3802 em cultivo submerso.** 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MORITZ, D. E., PEREIRA, E. B. NINOW, J. L. Avaliação da Produção de Lipase e Pigmento Monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 variando a fonte de nitrogênio no meio de cultivo. **SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações.** Florianópolis - SC: Anais CD-room. 2003

NAVARRO, C. M. E. **Otimização de um meio de cultura para a produção de *Candida utilis* a partir de glicerol.** 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

OCHAIKUL, D.; CHOTIRITTIKRAI, K.; WUTIGORNSOMBATKUL, J. C. S.. Studies on Fermentation of *Monascus purpureus* TISTR 3090 with Bacterial Cellulose from *Acetobacter xylinum* TISTR 967. **KMITL Sci. Tech. J.**, v. 6, n. 1, jan. – jun, 2006.

OLIVEIRA, C. G.; SGANZERLA, L. R.; PORTO, L. M; ANTÔNIO, R. G. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum* em glicose e glicerol como fontes de carbono. **SINAFERM – XIV Simpósio Nacional de Fermentações.** Florianópolis - SC: Anais CD-room. 2003.

OLIVEIRA, L. B. e COSTA, A. O. **Biodiesel:** Uma experiência de desenvolvimento sustentável, 2002.

OROZCO, S. F. B.; PEREIRA D. G.; KILIKIAN B. V. Influência do pH na Produção de Pigmentos Vermelhos e na Micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em Cultivo Submerso. **SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações.** Florianópolis - SC: Anais - artigo 133 CD-room. 2003.

PANAGOU, E. Z.; KATSABOXAKIS, C. Z.; NYCHAS, C. E. Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the *Conservolea* variety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 11-18, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal of Biotechnology**, p. 191-208, 2000.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel:** Uma aventura tecnológica num país engraçado. 2003. Disponível em: <[http:// www.tecbio.com.br](http://www.tecbio.com.br)>. Acesso em março de 2007.

PASTRANA, L.; BLANC P. J.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O; GOMA, G. Production of Red Pigments by *Monascus ruber* in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source. **Process Biochemistry**, v.30, n.4, p. 333-341, 1995.

PISAREVA, E. e KUJUMDZIEVA, A. Taxonomic investigation and growth characteristics of citrinin free *Monascus pilosus* C<sub>1</sub> strain. **Biotechnol. & Biotechnol.**, 2006.

PITT J. I., HOCKING A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Chapman & Hall, 1999.

RIBEIRO, S. A. L.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados de milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n. 2, 2003.

RODRIGUES, M. A. e IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ª Ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SABATER-VILAR, H.; MAAS, R. F. M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation Research**, v. 444, p. 7-16, 1999.

SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; DE CARVALHO, F. C.; NEGRI NETO, A.; MARQUES, S. A. Tendência de mercado para corantes na indústria de alimentos. **Agricultura em São Paulo**, p. 1-50, 1992.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Volume 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 1ª. Ed, 2001. 541p.

SERRA, E. J. P.; VENDRUSCOLO, F.; PITOL, L. O.; NINOW, J. L. Estabilidade Térmica do pigmento produzido por *Monascus ruber* em Cultivo submerso. **SINAFERM XV** – Simpósio nacional de Fermentações. Curitiba – PR: Anais CD-room (2007).

SHEU, F.; WANG, C. L.; SHYU, Y. T. Fermentation of *Monascus purpureus* on bacterial cellulose-nata and the color stability of Monascus-nata Complex. **Food Microbiology and Safety**, v. 65, n.2, p. 342-345, 2000.

SILVA, G. P. e CONTIERO, J. Bioconversão do glicerol em 1-3 propanodiol **SINAFERM - XV** Simpósio Nacional de Fermentações. Curitiba - PR: Anais CD-room (2007).

SILVEIRA, S. T.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. **LWT**, v. 41, p. 170-174, jan., 2008.

SINGH, P. K. e PHADWAL, K. Effect of nutrient depletion on  $\beta$ -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp.. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 55-58, 2003.

SOUZA, J. R.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, R L. B. Avaliação de microrganismos quanto à conversão do glicerol obtido do processo de produção do biodiesel em biossurfactantes. **SINAFERM XV** – Simpósio Nacional de Fermentações. Curitiba – PR: Anais CD-room (2007).

TAHERZADEH, M. J.; ADLER, L.; LIDÉN, G. Strategies for enhancy fermentative production of glycerol – a review. **Enzyme and microbial Technology**, v. 3, p. 153-66, 2002.

TENG, S. S. e FELDHEIM, W. Anka and anka pigment production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 280-282, 2001.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; BADINO JR., A. C. Influência da velocidade de alimentação de glicerol na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada. **SINAFERM - XIV** Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais CD-room..2003.

URIOSTE. D. **Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São Paulo, 2004.

YAZDANI, S .S. e GONZÁLES, K. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213-219, 2007.

YONGSMITH, B.; TABLOKA, W.; YONGMANITCHAI, W.; BAVAVODA, R. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 85-90, 1993.

WANG, S.; YEN, Y.; TSIAO, W.; CHANG, W.; WANG, C. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 31, p. 337-344, 2002.

WANG, Y.; JU, X.; ZHOU, Y. The variability of citrinin in *Monascus* type cultures. **Food Microbiology**, v. 22, p. 145-148, 2005.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

WISSGOTT, U. e BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, 1996.

WONG, H. C., KOEHLER, P. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **J Food Sci**, v.46, 1981:589-592

ZAR, J. (1984), **Biostatistical Analysis**. 2<sup>a</sup> ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall.

## APÊNDICE A

TABELA A.1. Valores obtidos para o teste de diferenças de declividades de retas (ZAR).

Meio	$\Sigma x^2$	$\Sigma xy$	$\Sigma y^2$	N	bc	SS	DF
Glicose 1%	611712	52308	4548,59	14	2,3376	17,05431	12
Glicerol 0,5%	611712	42760,8	3011,24	14	1,8168	8,703042	12
Glicerol 1%	611712	44342,4	3244,22	14	1,9128	10,38685	12
Glicerol 2%	611712	43752	3156,17	14	1,8744	9,222266	12
Glicerol 3%	611712	46000,8	3497,38	14	2,0016	12,58192	12
PDA	611712	43291,2	3073,57	14	1,7784	7,295318	12
Ágar	611712	43080	3039,49	14	1,716	7,366472	12
Ágar + Nutrientes	611712	23008,8	896,27	14	0,8448	18,22662	12
Rp	4893696	338544	24466,93	112	14,2824	90,8368	96
Rc						1046,587	83

x = variável independente da regressão linear; y = variável dependente da regressão linear; n = tamanho da amostra para cada regressão;

bc = declividade da reta, SS = resíduo comum; DF = resíduo ponderado, Rp = regressão ponderada; Rc = regressão comum.

## APÊNDICE B

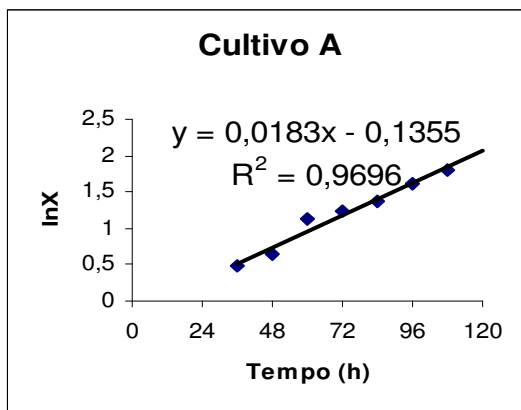
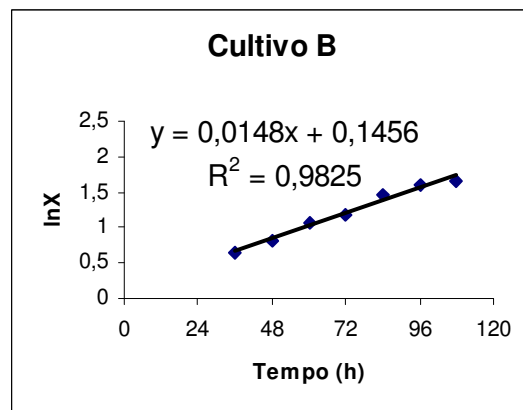
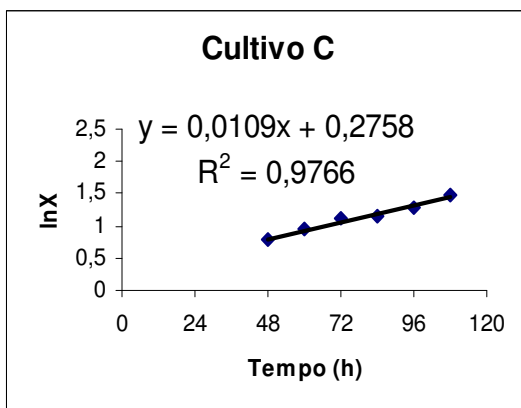
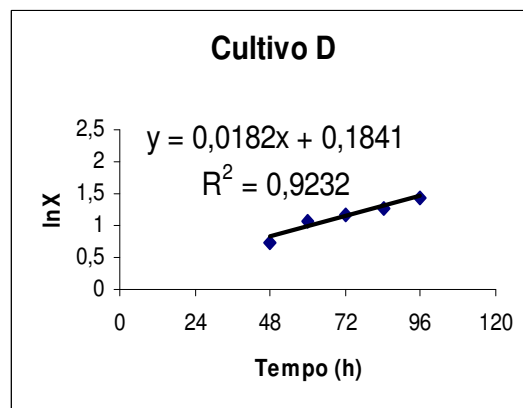
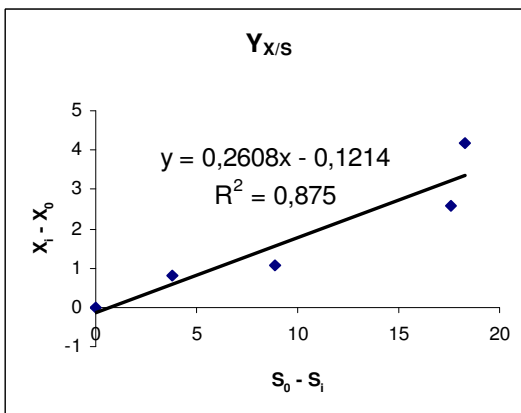
FIGURA B.1 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para A.FIGURA B.2 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para B.FIGURA B.3 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para C.FIGURA B.4 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para D.

FIGURA B.5 – Fator de conversão de glicose em células para o Cultivo A.

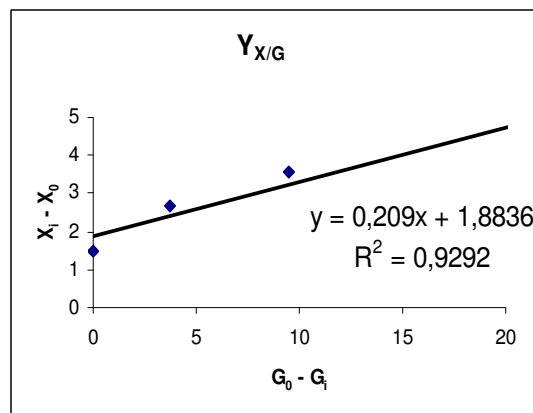


FIGURA B.6 – Fator de conversão de glicerol em células para o Cultivo D.



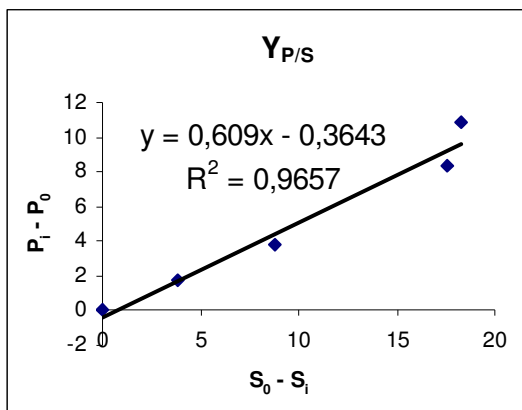


FIGURA B.7 – Fator de conversão de glicose em pigmentos para o Cultivo A.

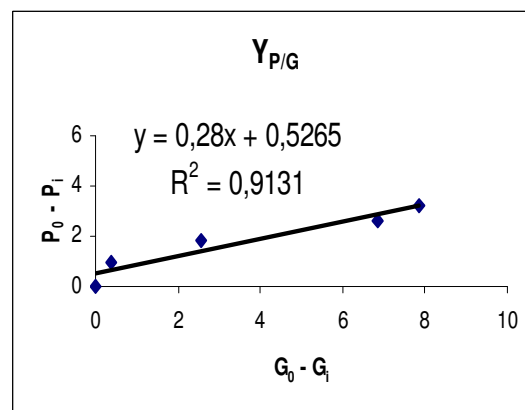


FIGURA B.8 – Fator de conversão de glicerol em pigmentos para o Cultivo D.

## APÊNDICE C

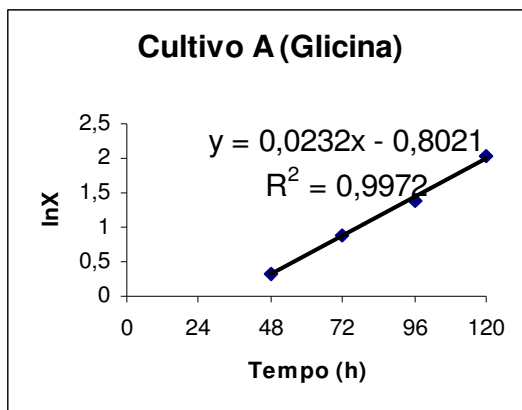


FIGURA C.1 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para A.

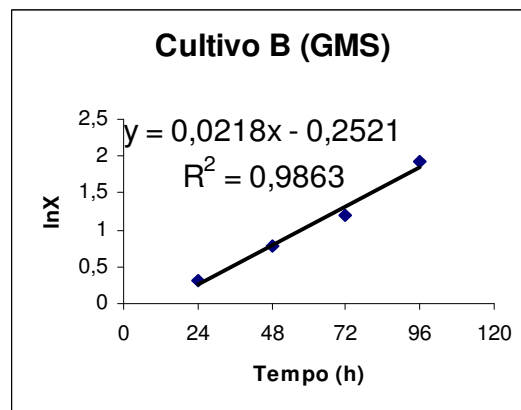


FIGURA C.2 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para B.

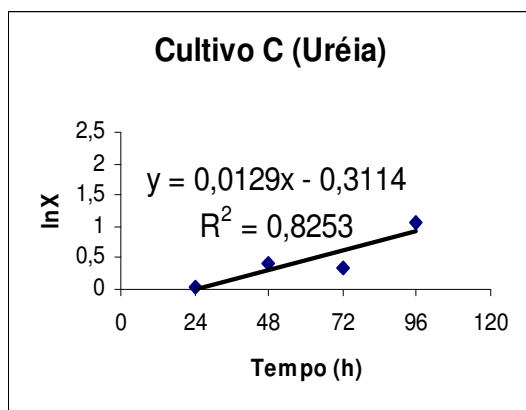


FIGURA C.3 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para C.

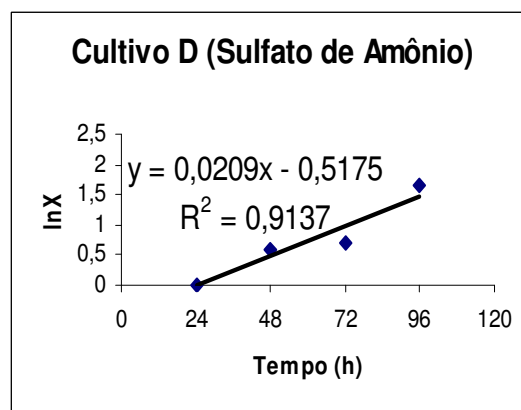
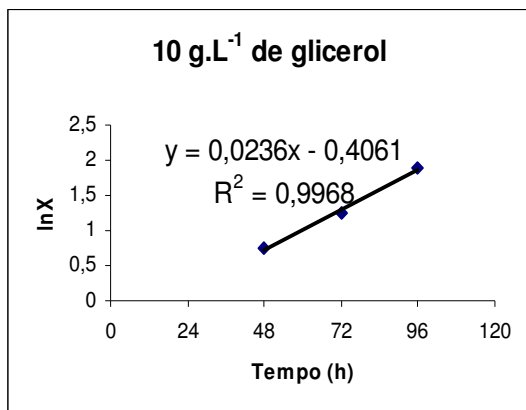
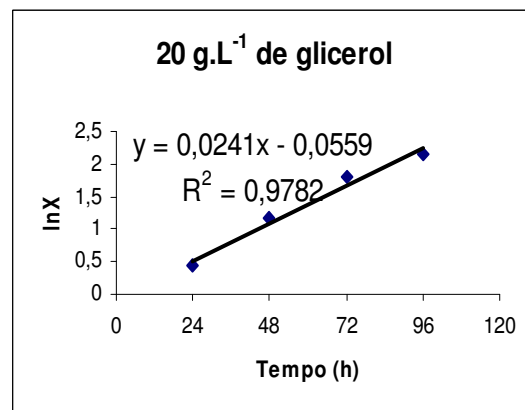
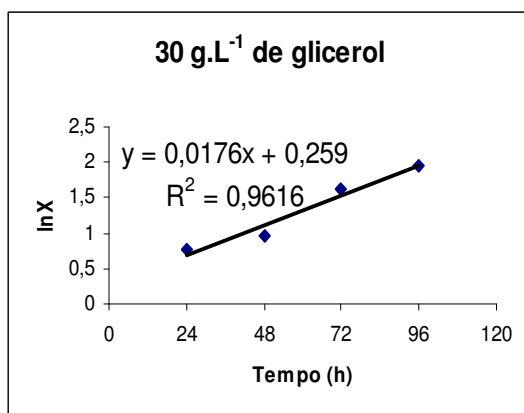
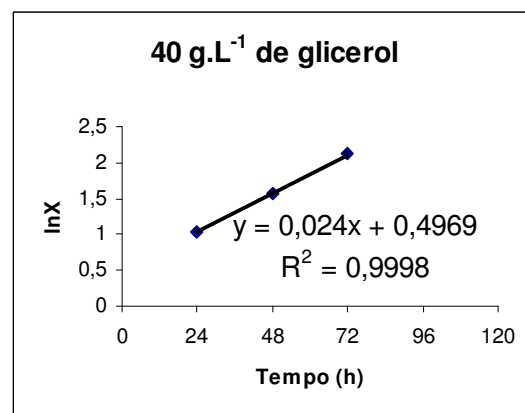
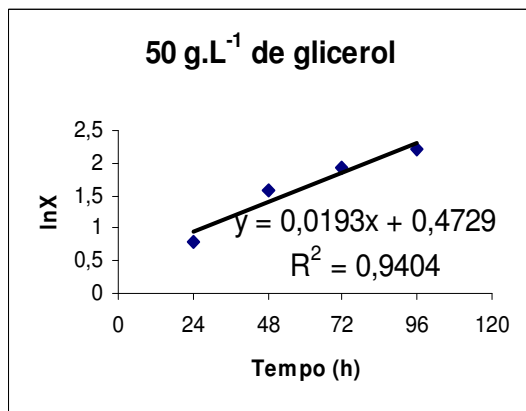
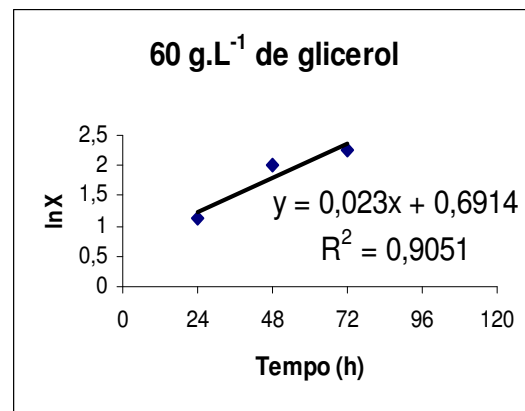


FIGURA C.4 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para D.

## APÊNDICE D

FIGURA D.1 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 10 g.L<sup>-1</sup>.FIGURA D.2 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 20 g.L<sup>-1</sup>.FIGURA D.3 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 30 g.L<sup>-1</sup>.FIGURA D.4 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 40 g.L<sup>-1</sup>.FIGURA D.5 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 50 g.L<sup>-1</sup>.FIGURA D.6 – Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 60 g.L<sup>-1</sup>.

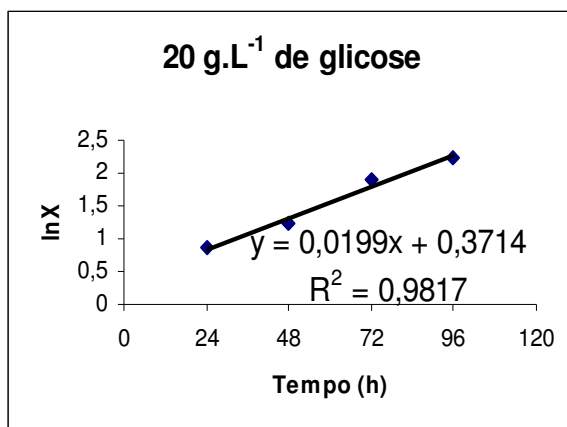


FIGURA D.7 - Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose.

## APÊNDICE E

TABELA E.1 – Coeficientes de regressão para a produtividade de pigmentos vermelhos ( $\text{UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ). L: termo linear; Q: termo quadrático.

Variável	Coeficiente de regressão	Erro padrão	teste-t	Valor de p
Média	-0,014	0,003	-4,89	0,000*
Glicerol (L)	0,0004	0,000	2,86	0,011*
Glicerol (Q)	-0,000	0,000	-1,88	0,080
GMS (L)	0,017	0,001	16,66	0,000*
GMS (Q)	-0,001	0,001	-11,69	0,000*

\* Valores significativos  $p < 0,05$

TABELA E.2 - Coeficientes para a biomassa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). L: termo linear; Q: termo quadrático.

Variável	Coeficiente de regressão	Erro padrão	teste-t	Valor de p
Média	2,11	0,394	5,34	0,000*
Glicerol (L)	0,072	0,019	3,75	0,002*
Glicerol (Q)	-0,0006	0,000	-2,50	0,024*
GMS (L)	0,92	0,136	6,73	0,000*
GMS (Q)	-0,052	0,0132	-3,95	0,001*

\* Valores significativos  $p < 0,05$